

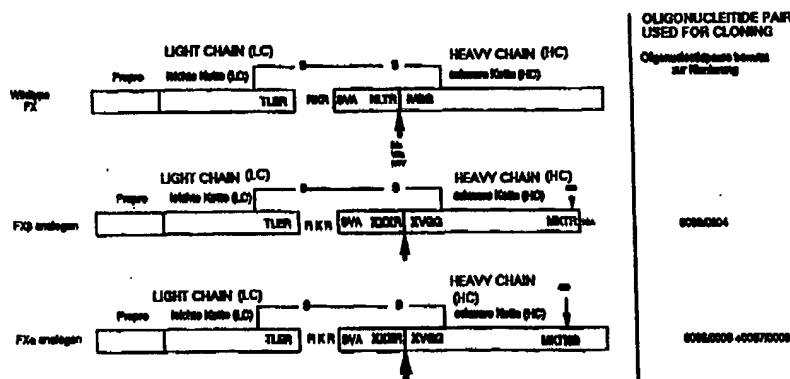


**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 15/57, 9/64, A61K 38/48</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/38317</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	3. September 1998 (03.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/AT98/00045</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, MX, NO, PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>27. Februar 1998 (27.02.98)</b>			
(30) Prioritätsdaten: <b>A 335/97 27. Februar 1997 (27.02.97) AT</b>		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HIMMELSPACH, Michele [FR/AT]; Breitstetten 19, A-2285 Leopoldsdorf (AT). SCHLOKAT, Uwe [DE/AT]; Hauptstrasse 51, A-2304 Orth/Donau (AT). DÖRNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlin-gasse 17, A-1230 Wien (AT). FISCH, Andreas [DE/CH]; Tellstrasse 19, CH-9000 St. Gallen (CH). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).			
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			

(54) Title: **FACTOR X ANALOGUES WITH A MODIFIED PROTEASE CLEAVAGE SITE**

(54) Bezeichnung: **FAKTOR X-ANALOGUE MIT MODIFIZIERTER PROTEASESPALTSTELLE**



**(57) Abstract**

The invention relates to factor X analogues which have a modification in the area of the naturally occurring factor Xa activating cleavage site, said modification representing a processing site of a protease which does not naturally cleave in this area of the factor X sequence. The invention also relates to preparations containing the innovative factor X analogues and to methods for the production thereof.

**(57) Zusammenfassung**

Beschrieben werden Faktor X-Analoga, welche eine Modifikation im Bereich der natürlicherweise vorkommenden Faktor Xa-Aktivierungspaltstelle aufweisen, wobei die Modifikation eine Prozessierungsstelle einer nicht-natürlicherweise in diesem Bereich der Faktor X-Sequenz spaltenden Protease darstellt, Präparationen enthaltend die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga sowie Verfahren zu deren Herstellung.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Faktor X-Analoga mit modifizierter Proteasespaltstelle

Die Erfindung betrifft Faktor X-Analoga mit einer Modifikation im Bereich des Aktivierungspeptids, eine Präparation enthaltend die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga sowie ein Verfahren zur Herstellung von einzelkettigen und zweikettigen Faktor X-Analogen.

Nach Initiierung des Blutgerinnungsprozesses verläuft die Gerinnungskaskade durch die sequentielle Aktivierung von verschiedenen Proenzymen (Zymogenen) im Blut in ihre aktive Formen, den Serinproteasen. Dazu gehören u.a. Faktor XII/XIIa, Faktor XI/XIa, Faktor IX/IXa, Faktor X/Xa, Faktor VII/VIIa und Prothrombin/Thrombin. Die meisten dieser Enzyme sind im physiologischen Zustand nur aktiv, wenn sie in einem Komplex an einer Membranoberfläche assoziiert sind. Ca-Ionen sind in viele dieser Prozesse involviert. Die Blutgerinnung folgt entweder dem intrinsischen Weg, bei dem alle Proteinkomponenten im Blut vorhanden sind, oder dem extrinsischen Weg, bei dem der Zellmembrangewebefaktor eine kritische Rolle spielt. Der Wundverschluß erfolgt schließlich durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin.

Der Prothrombinase-Komplex ist verantwortlich für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin ist ein wichtiges Enzym, das sowohl als Prokoagulant als auch als Antikoagulant wirken kann. Der Prothrombinase-Komplex, an dem u.a. Faktor Va (als Cofaktor) und Faktor Xa (als Serinprotease) beteiligt sind, assembliert in einer Ca-abhängigen Assoziation an der Oberfläche von Phospholipiden. Es wird diskutiert, daß dabei die katalytische Komponente des Prothrombinase-Komplexes Faktor Xa ist.

Faktor X (Stuart/Prower-Faktor) ist ein Vitamin K-abhängiges Koagulationsglykoprotein, das durch die intrinsische und extrinsische Blutgerinnungskaskade aktiviert werden kann. Das primäre Translationsprodukt von Faktor X (pre-pro-FX) besitzt 488 Aminosäuren und wird von der Leber oder humanen Hepatoma-Zellen zunächst als einzelkettiges 75 kD Vorläuferprotein synthetisiert.

- 2 -

Im Plasma liegt Faktor X weitgehend als zweikettiges Molekül vor (Fair et al, 1984, Blood 64:194-204).

Während der Biosynthese wird nach Abspaltung der pre-Sequenz durch eine Signalpeptidase (zwischen Ser23/Leu24) und des Pro-peptides (zwischen Arg40/Ala41) das einzelkettige Faktor X-Molekül durch Prozessierung und Entfernung des Tripeptides Arg180-Lys181-Arg-182 in die zweikettige Form, bestehend aus der ca. 22 kD leichten Kette und der ca. 50 kD schweren Kette, die miteinander über eine Disulfid-Brücke verbunden sind, gespalten (Figur 1). Faktor X zirkuliert im Plasma daher als zweikettiges Molekül.

Während des Blutgerinnungsprozesses wird Faktor X vom inaktiven Zymogen zur aktiven Protease Faktor Xa durch limitierte Proteolyse konvertiert, wobei die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa in einem von 2 membrangebundenen Komplexen erfolgen kann: dem extrinsischen Faktor VIIa/Gewebefaktor-Komplex oder dem intrinsischen Faktor VIIa-Faktor IXa-Phospholipid-Ca-Komplex oder "Tenase-Komplex" (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185:647-658). Eine proteolytische Spaltung zwischen Aminosäuren Arg 234/Ile 235 führt zur Freisetzung eines 52 Aminosäuren langen Aktivierungspeptids vom N-Terminus der schweren Kette und damit zur Bildung des aktiven Enzyms, Faktor Xa. Das katalytische Zentrum des Faktor Xa ist auf der schweren Kette lokalisiert.

Die Aktivierung über den Faktor VIIa-TF(extrinsischen)-Komplex führt zur Bildung von Faktor Xa $\alpha$  (35 kD) und Faktor Xa $\beta$  (31 kD), wobei bei geringen Konzentrationen von Faktor VIIa im Komplex auch ein Polypeptid von 42 (kD) auftritt. Die Bildung von Faktor Xa $\alpha$  erfolgt über eine Spaltung bei Arg234/Ile 235 der schweren Kette und repräsentiert die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. Das Auftreten von Faktor Xa $\beta$  resultiert vermutlich aus einer autokatalytischen Spaltung bei Arg469/Gly470 im C-Terminus der schweren Kette von Faktor Xa $\alpha$  und der Abspaltung eines 4.5 kD-Peptides. Faktor Xa $\beta$  besitzt ebenfalls wie Faktor Xa $\alpha$  katalytische Aktivität. Es wurde jedoch gezeigt, daß durch die Spaltung von Faktor Xa $\alpha$  zu Faktor Xa $\beta$  eine Plasminogen-Bindungsstelle entsteht und Faktor Xa $\beta$  gegebenenfalls fibrinolytische Aktivi-

- 3 -

tät aufweist bzw. an Fibrinolyse als Cofaktor beteiligt ist. Die Umwandlung von Faktor X $\alpha$  zu Faktor X $\beta$  ist jedoch langsamer als die Bildung von Thrombin, wodurch eine Initiierung der Fibrinolyse vor Ausbildung eines Blutklots verhindert wird (Prydzial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:16614-16620; Prydzial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:16621-16626).

Das 42 kD-Polypeptid resultiert aus einer Prozessierung im C-Terminus der schweren Kette zwischen Arg469/Gly470 ohne vorherige Prozessierung zwischen Arg234/Ile 235. Dieses Intermediat besitzt ebenso wie ein Faktor X $\gamma$ -Fragment, das durch Proteolyse bei Lys370 entsteht, keine katalytische Aktivität (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185:647-658; Prydzial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:16614-16620).

Die Aktivierung von Faktor X im intrinsischen Weg wird katalysiert durch den Faktor IXa-Faktor VIIIa-Komplex. Während der Aktivierung werden die gleichen Prozessierungsprodukte erhalten, jedoch wird das Faktor X $\beta$ -Produkt in einem höheren Ausmaß erhalten als andere Faktor X-Prozessierungsprodukte (Jesty et al., 1974, J. Biol. Chem. 249:5614).

In vitro kann Faktor X beispielsweise durch Russell's Viper Venom (RVV) oder Trypsin (Bajaj et al., 1973, J. Biol. Chem. 248:7729-7741) oder gereinigte physiologische Aktivatoren, wie FVIIa/TF-Komplex oder Faktor IXa/Faktor VIIIa-Komplex aktiviert werden (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185:647-658).

Kommerziell erhältliche Faktor X-Produkte aus Plasma enthalten zumeist eine Mischung aus Faktor X $\alpha$  und Faktor X $\beta$ , da nach Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa in erster Linie Faktor X $\alpha$  entsteht, der in einem autokatalytischen Prozeß wiederum zu Faktor X $\beta$  gespalten wird. Um ein einheitliches Faktor Xa-Produkt mit hoher molekularer Integrität herzustellen, wurde in der EP 0 651 054 vorgeschlagen, Faktor X mit RVV über einen längeren Zeitraum zu aktivieren, sodaß das resultierende Endprodukt im wesentlichen Faktor X $\beta$  enthielt. Sowohl die Nebenprodukte, beispielsweise Faktor X $\alpha$ , als auch die Protease wurden anschließend durch mehrere chromatographische Schritte entfernt.

- 4 -

Die cDNA für Faktor X wurde isoliert und charakterisiert (Leytus et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:3699-3702; Fung et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:3591-3595). Humaner Faktor X wurde in vitro in verschiedenen Zelltypen, wie humanen embryonalen Nierenzellen oder CHO-Zellen exprimiert (Rudolph et al., 1997, Prot. Expr. Purif. 10: 373-378; Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). Es wurde jedoch festgestellt, daß bei der rekombinanten Expression von humanem Faktor X die Prozessierung an Position Arg40/Ala41 im Gegensatz zur in vivo-Situation ineffizient erfolgt und unterschiedliche N-Termini an der leichten Kette von Faktor X entstehen (Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). Rekombinanter Faktor X (rFX) wurde durch RVV in vitro zu rFaktor Xa (rFXa) aktiviert oder rFXa direkt exprimiert, wobei das Aktivierungspeptid von Aminosäure 183 bis Aminosäure 234 deletiert und durch ein Tripeptid ersetzt wurde, um eine Prozessierung unmittelbar in eine zweikettige rFXa-Form zu ermöglichen. Gereinigter rFX wurde zu etwa 70% in leichte und schwere Kette prozessiert, während die verbleibenden 30% einzelkettigen rFX mit 75 kD darstellten. Direkte Expression von rFXa führte zwar zur Bildung von aktivem Faktor Xa, jedoch auch zu inaktiven Intermediaten. Wolf et al. (1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730) stellten weiterhin eine verringerte Aktivität von rekombinantem Faktor X fest, die sie auf die schlechtere Aktivierbarkeit des rFX durch RVV sowie auf die inaktive Population an Proteinen und Polypeptiden des einzelkettigen Vorläufermoleküls zurückführten. Insbesondere fanden sie eine hohe Instabilität von rFXa bei Expression durch rekombinante Zellen, was sie auf die hohe Autoproteolyse zurückführten.

Um die Funktion des C-terminalen Peptides von Faktor X $\alpha$  zu untersuchen, führten Eby et al. (1992, Blood 80 (Suppl. 1): 1214 A) ein Stopcodon an Position Gly430 der Faktor X-Sequenz ein. Sie fanden jedoch keinen Unterschied zwischen der Aktivierungsrate von Faktor Xa (FX $\alpha$ ) mit b-Peptid oder einer Deletionsmutante ohne  $\beta$ -Peptid (FX $\beta$ ).

Faktor Xa ist ein wichtiger Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes und könnte daher zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, beispielsweise bei Hämophilie, verwendet

werden.

Insbesondere die Behandlung von Hämophilie-Patienten mit Faktor VIII- oder Faktor IX-Defizienz mit Faktoren-Konzentraten, hergestellt aus Plasma, wird bei längeren Therapiezeiten oft dadurch kompliziert, daß inhibitorische Antikörper gegen diese Faktoren gebildet werden. Es wurde daher eine Reihe von Alternativen entwickelt, um Hämophilie-Patienten mit Faktoren mit einer By-pass-Aktivität zu behandeln. So wurde die Verwendung von Prothrombin-Komplex-Konzentrat, partiell aktiviertem Prothrombinase-Komplex (APPC), Faktor VIIa oder FEIBA vorgeschlagen. Kommerzielle Präparate mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität (FEIBA) sind beispielsweise FEIBA® oder Autoplex®. FEIBA etwa enthält vergleichbare Einheiten an Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X und FEIBA, geringe Mengen an Faktor VIII und Faktor V, sowie Spuren von aktivierten Koagulationsfaktoren, wie Thrombin und Faktor Xa bzw. einen Faktor mit Faktor X-ähnlicher Aktivität (Elsinger, 1982, Activated Prothrombin Complex Concentrates. Ed. Mariani, Russo, Mandelli, p.77-87). Elsinger weist insbesondere auf die Bedeutung einer "Faktor Xa-like"-Aktivität in FEIBA hin. Faktor VIII-Bypass-Aktivität wurde von Giles et al. (1988, British J. Haematology 9:491-497) für eine Kombination von gereinigtem Faktor Xa und Phospholipiden im Tiermodell gezeigt.

Es besteht daher ein großer Bedarf und eine Reihe von verschiedenen Anwendungsgebieten für Faktor X/Xa oder Faktor X/Xa-ähnlichen Proteinen, entweder allein oder als Bestandteil eines Koagulationskomplexes in der Blutstillungstherapie.

Die Halbwertszeit von Faktor Xa ist gegenüber dem Zymogen sowohl in vivo als auch in vitro stark herabgesetzt. So kann etwa Faktor X in Glycerin 18 Monate stabil aufbewahrt werden, während Faktor Xa unter gleichen Bedingungen nur 5 Monate stabil ist (Bajaj et al., 1973, J. Biol. Chem. 248:7729-2241) bzw. in Glycerin bei 4°C nach 8 Monaten eine Reduktion der Aktivität um mehr als 60 % zeigt (Teng et al., 1981, Thrombosis Res. 22: 213-220). Die Halbwertszeit von Faktor Xa beträgt lediglich 30 Sekunden im Serum.

- 6 -

Aufgrund der Instabilität von Faktor Xa wurde vorgeschlagen, Faktor X-Präparate zu verabreichen (US 4,501,731). Bei lebensbedrohenden Blutungen, insbesondere bei Hämophilie-Patienten, ist jedoch eine Verabreichung von Faktor X wirkungslos, da durch das Fehlen des funktionellen "Tenase-Komplexes" im intrinsischen Blutgerinnungsweg keine ausreichende Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa erfolgen kann und die Aktivierung über den extrinsischen Weg oftmals zu langsam erfolgt, um eine rasche Wirkung zu erzielen. Zudem ist bei Hämophilie-Patienten ausreichend Faktor X vorhanden, der jedoch im Vergleich zu Faktor Xa eine 1000fach geringere Prothrombinase-Aktivität besitzt. In solchen Fällen ist es erforderlich, aktivierten Faktor Xa direkt, gegebenenfalls zusammen mit Phospholipiden, wie bei Giles et al. (1988. British J. Haematology 9:491-497) beschrieben oder mit anderen Koagulationsfaktoren etwa mit Faktor VIII By-pass-Aktivität, zu verabreichen.

Bei der Herstellung von Faktor Xa aus Faktor X erfolgte die Aktivierung bisher zumeist über unphysiologische Aktivatoren tierischen Ursprungs, wie RVV oder Trypsin, wobei jedoch absolut sicher gestellt sein mußte, daß das Endprodukt vollständig frei von diesen Proteasen ist. Wie oben schon erwähnt, werden bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa eine Vielzahl teilweise auch inaktiver Intermediate gebildet (Bajaj et al., 1973, J.Bio. Chem. 248:7729-7741, Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185: 647-658). Die Anwesenheit solcher Intermediate führt zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität des Produktes und gegebenenfalls auch zu solchen Intermediaten, die als Antagonisten der aktiven Serinprotease fungieren können. Zur Herstellung eines einheitlichen, reinen Produktes mit hoher spezifischer Aktivität sind daher bei konventionellen Methoden aufwendige Verfahren zur Aktivierung sowie zur chromatographischen Reinigung erforderlich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher eine Präparation zur Verfügung zu stellen, die ein Polypeptid mit Faktor X/Xa-Aktivität enthält, das eine hohe Stabilität aufweist und das ohne die Verwendung einer der üblichen Proteasen, insbesondere tierischen Ursprungs, wie beispielsweise RVV oder Trypsin zu Faktor



- 7 -

Xa aktiviert werden kann. Ein weiteres Ziel ist es eine pharmazeutische Präparation mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität bereitzustellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Faktor X-Analogon zur Verfügung gestellt wird, das eine Modifikation im Bereich der natürlicherweise vorkommenden Faktor Xa-Aktivierungsspaltstelle aufweist. Die Modifikation im Bereich der Aktivierungsspaltstelle ist eine neue, nicht-natürlicherweise an dieser Position im Polypeptid vorkommende Erkennungs- bzw. Prozessierungsstelle für eine Protease, die das Polypeptid normalerweise nicht an dieser Stelle spaltet.

Das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon weist dabei insbesondere im Aktivierungspeptid, das bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa abgespalten wird, eine Modifikation auf. Die Modifikation betrifft dabei mindestens eine Aminosäure innerhalb der Aminosäuresequenz des Aktivierungspeptids des Faktor X. Die Modifikation ist dabei besonders im C-terminalen Bereich des Aktivierungspeptids und stellt mindestens einen Austausch mindestens einer Aminosäure zwischen Position Gly228 und Arg234 der Faktor X-Aminosäuresequenz dar. Die Position der Aminosäuren ist dabei bezogen auf die Numerierung gemäß der in Fig. 1 dargestellten Sequenz beginnend mit Met1 und endend mit Lys488.

Die Modifikation im erfindungsgemäßen Faktor X-Analogon ist vorzugsweise ein Austausch einer an dieser Stelle vorkommenden Faktor VIIa- bzw. Faktor IXa-Prozessierungsstelle gegen eine alternative Spaltstelle einer anderen Protease. Die Modifikation kann dabei eine Substitution mindestens einer Aminosäure oder eine Insertion einer Peptidsequenz, die eine Proteaseerkennung- bzw. Spaltstelle darstellt, sein. Die Modifikation im erfindungsgemäßen Faktor X-Analogon ist dabei vorzugsweise derart, daß sie für eine Protease aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 (wie in Barr et al., 1991, Cell 66:1-3 oder der US 5,460,950 beschrieben), der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor IIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, eine Erkennungs- bzw. Spaltsequenz dar-

stellt.

Die Modifikation ist vorzugsweise so ausgewählt, daß die Prozessierung durch eine dieser Proteasen zu einem dem nativen Faktor Xa entsprechenden Polypeptid führt, das im wesentlichen der natürlich vorkommenden Faktor Xa-Sequenz gleicht und ebenfalls Faktor Xa-Aktivität aufweist.

Um eine optimale Prozessierung zu erreichen, kann es in einzelnen Fällen notwendig sein, zusätzlich die Aminosäure Ile235 auszutauschen. Vorzugsweise sollte die NH<sub>2</sub>-terminale Aminosäure Isoleucin der schweren Kette jedoch nach Aktivierung erhalten bleiben, da dieser Aminosäure bei der Bildung der Substratbindungstasche eine wesentliche Funktion zukommt (Watzke et al., 1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis ed. Katherine High & Harold Roberts). Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga zeigen einen strukturellen Unterschied, insbesondere auf Aminosäure-Ebene im Vergleich zur nativen Faktor X-Sequenz, besitzen jedoch eine vergleichbare Aktivierbarkeit, wie natürlich vorkommender Faktor X bzw. nach Aktivierung Faktor Xa-Aktivität.

Die Erfindung stellt dabei beispielhaft eine Anzahl von Faktor X-Analogen zur Verfügung, die eine Modifikation im Aktivierungspeptid in bezug auf die natürlich vorkommende Faktor X-Sequenz und eine veränderte Proteasespezifität aufweisen.

Modifikationen können an einer oder mehreren Positionen im Bereich zwischen Aminosäure Gly228 und Arg234, und gegebenenfalls Ile235, bezogen auf die Faktor X-Sequenz mit der Numerierung mit Met1 bis Lys 488 gemäß Fig. 1, sein. Aminosäuresubstitutionen können dabei sein an Position Ile235 (R1), Arg234, Thr233 (R2), Leu232 (R3), Asn231 (R4), Asn230 (R5) und Asp229 (R6), wobei jedoch vorzugsweise Arg234 unverändert bleibt.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga enthalten vorzugsweise eine Faktor X-Sequenz mit Gly 228-R6-R5-R4-R3-R2-Arg234 mit R1= Ile, Val, Ala, Ser oder Thr; R2= Thr, Pro, Gly, Lys oder Arg; R3= Leu, Phe, Lys, Glu, Met, Gln, Ser, Val, Arg oder Pro; R4= Asn, Asp, Ile, Ser, Met, Pro, Thr, Lys oder Arg; R5= Asn, Lys,

Ser, Glu, Ala, Gln, His oder Arg und R6= Asp, Phe, Thr, Arg, Leu oder Ser, darstellt.

Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Faktor X-Analoge sind dabei Faktor X-Analoge, die eine Modifikation aufweisen mit

- a) R1=Val, R2=Thr, R3=Phe, R4=Asp, R5=Asn und gegebenenfalls R6=Phe (Figur 2 A) und durch Faktor XIa prozessiert wird;
- b) R1=Ser, R2=Arg, R3=Thr, R4=Leu (Fig. 2 B) und durch FIIa prozessiert wird;
- c) R1=Ile, R2=Pro, R3=Lys, R4=Ile und gegebenenfalls R5=Lys und/oder R6=Thr (Fig. 2 C) oder  
R1=Ile, R2=Thr, R3=Ser, R4=Thr und gegebenenfalls R5=Lys und/oder R6=Thr (Fig. 2 I) und durch Faktor XIIa prozessiert werden;
- d) R1=Ile, R2=Thr, R3=Met, R4=Ser und gegebenenfalls R5=Ser und/oder R6=Leu (Fig. 2 D) und durch Kallikrein prozessiert wird;
- e) R1=Ile, R2=Gly, R3=Gln, R4=Pro und gegebenenfalls R5=Lys und/oder R6=Ser (Fig. 2 H) oder  
R1=Ile, R2=Thr, R3=Lys und R4=Met (Fig. 2 E) oder  
R1=Ile, R2=Gly, R3=Glu und R4=Ile (Fig. 2 F) und durch Faktor Xa prozessiert werden;
- f) R1=Ile, R2=Lys, R3=Arg, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Glu und/oder R6=Leu oder  
R1=Ile, R2=Thr, R3=Val, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Ala und/oder R6=Leu oder  
R1=Ile, R2=Arg, R3=Val, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Gln und/oder R6=Leu oder  
R1=Ile, R2=Arg, R3=Arg, R4=Arg und gegebenenfalls R5=His und/oder R6=Leu oder  
R1=Ile, R2=Lys, R3=Pro, R4=Arg und gegebenenfalls R5=Asn und/oder R6=Leu oder  
R1=Ile, R2=Lys, R3=Arg, R4=Ile und gegebenenfalls R5=Arg und/oder R6=Leu oder  
R1=Ile, R2=Lys, R3=Ser und R4=Arg oder  
R1=Ile, R2=Thr, R3=Val und R4=Arg oder  
R1=Ile, R2=Lys, R3=Leu und R4=Arg (siehe alle Fig. 2 G),

- 10 -

wobei die unter f) genannten durch eine bibasische Endoprotease, wie Furin, PACE, Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 oder einem Derivat einer dieser Proteasen prozessiert werden.

Eine mögliche Auswahl von Modifikationen und Aminosäureaustauschen, die zu einer veränderten Proteasespezifität führen, sind in Figur 2 A-I angeführt.

Die Modifikationen können dabei beispielsweise durch gerichtete in vitro Mutagenese oder PCR oder andere aus dem Stand der Technik bekannte gentechnische Methoden durchgeführt werden, die dazu geeignet sind, spezifisch eine DNA-Sequenz zu verändern, um gezielt Aminosäureaustausche auszuführen.

Die Aktivierung des erfindungsgemäßen Faktor X-Analogons zu einem nativen Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogen erfolgt gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise durch eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, Faktor IIa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen.

Eine der Schwierigkeiten bei der Herstellung von aktivem Faktor Xa ist seine Instabilität, da durch Autokatalyse neben Faktor Xa $\alpha$  und Faktor Xa $\beta$  auch andere, inaktive Intermediate entstehen. Zur Herstellung von im wesentlichen intakten, aktiven Faktor X/Xa- bzw. Faktor X/Xa-ähnlichen Molekülen wäre es daher wünschenswert, nur solche Proteine zu erhalten, die zu stabilen Endprodukten führen.

Es ist bekannt, daß eine bevorzugte Spaltstelle für die Prozessierung von Faktor Xa $\alpha$  (Fxa $\alpha$ ) zu Faktor Xa $\beta$  (Fxa $\beta$ ) zwischen Arg469/Gly470 liegt. Aufgrund von Untersuchungen von Eby et al. (1992, Blood. Vol. 80, Suppl. 1, 1214) wird neben einem prominenten carboxyterminalen Peptid (Aminosäurereste 476-487) von Faktor X ein weiteres kürzeres Peptid (Aminosäurereste 474 bis 477) gefunden, das durch Autokatalyse von Faktor Xa $\alpha$  entsteht.

- 11 -

Um eine gezielte Prozessierung von intaktem Faktor X zu im wesentlichen aktivem Faktor Xa zu focussieren, ohne dabei inaktive Prozessierungs-Intermediate zu erhalten, weisen die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga gegebenenfalls weitere Modifikationen auf.

Das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon weist daher gemäß einer besonderen Ausführungsform eine weitere Modifikation im C-terminalen Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz auf.

Gemäß einer Ausführungsform weist ein Faktor X-Analogon der oben beschriebenen Art ein intaktes  $\beta$ -Peptid ( $Fx\alpha$ ) auf. Das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon besitzt dabei insbesondere eine Modifikation im Bereich der C-terminalen  $\beta$ -Peptidspaltstelle, die verhindert, daß nach Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa eine Abspaltung des  $\beta$ -Peptids von Faktor X erfolgt. Dadurch wird ein Faktor Xa-Molekül erhalten, das bis zu 100% als intaktes Faktor Xa $\alpha$ -Molekül isoliert werden kann.

Die Modifikation kann eine Mutation, Deletion oder Insertion im Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz zwischen Aminosäureposition Arg469 und Ser476 und gegebenenfalls von Lys 370 sein. Bevorzugt ist jedoch eine Aminosäuresubstitution, bei der durch den Aminosäureaustausch eine die Struktur und damit gegebenenfalls die Funktion und Aktivität des Proteins beeinflussende Faltung des Polypeptides nicht erfolgen kann.

Gemäß einer Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga einen Austausch einer der Aminosäuren an Position Arg469 und/oder Gly470, wobei Arg469 vorzugsweise gegen Lys, His oder Ile und Gly470 vorzugsweise gegen Ser, Ala, Val oder Thr ausgetauscht ist.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga können neben einer Mutation an Position Arg469 und/oder Gly470 eine weitere Mutation an Position Lys370 und/oder Lys475 und/oder Ser476 aufweisen.

Durch eine Aminosäuresubstitution an einer dieser Positionen wird eine Prozessierung von Faktor Xa $\alpha$  zu Faktor Xa $\beta$  bzw. Faktor

- 12 -

Xay vermieden, da die natürlicherweise vorkommende(n) Prozessierungssequenz(en) derart modifiziert ist (sind), daß eine gegebenenfalls autokatalytische Abspaltung des Carboxy-terminalen Peptids nicht mehr erfolgen kann.

Gemäß einer anderen Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon eine Deletion des carboxyterminalen  $\beta$ -Peptids (FX $\beta$ ) auf. Ein solches Faktor X-Analogon kann hergestellt werden, indem eine cDNA kodierend für ein Faktor X-Analogon in einem rekombinanten Expressionssystem exprimiert wird, wobei nur die Sequenzen kloniert werden, die für die Aminosäuren Met1 bis Arg469 kodieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich der Faktor X-Sequenz auf. Das Translationsstoppsignal ist dabei vorzugsweise an einer Position, die einer nach natürlicher Prozessierung entstehenden C-terminalen Aminosäure folgt. Das Translationsstoppsignal ist daher vorzugsweise an Position der Aminosäure 470 der Faktor X-Sequenz, damit das endständige Arg469 des Faktor X $\alpha$  erhalten bleibt. Dazu wird das für die Aminosäure Gly470 kodierende Kodon GGC gegen TAA, TAG oder TGA substituiert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Faktor X-Analoga, die durch Behandlung mit einer entsprechenden Protease in vitro zu nativem Faktor X $\alpha$  bzw. einem Faktor X $\alpha$ -Analogon aktiviert werden. Abhängig vom Faktor X-Analogon, das eingesetzt und aktiviert wird, wird ein dem nativen Faktor X $\alpha$  entsprechendes und im wesentlichen identes Polypeptid erhalten bzw. ein Polypeptid, das zwar Faktor X $\alpha$ -Aktivität aufweist, jedoch in bezug auf die native Faktor X $\alpha$ -Sequenz Modifikationen aufweist, die jedoch nicht die biologische Aktivität beeinträchtigen. Bei Aktivierung von Faktor X-Analogen, die die Modifikation im Bereich des Aktivierungspeptids in der Sequenz des Aktivierungspeptids aufweisen, werden ausschließlich dem nativen Faktor X $\alpha$ -Molekül entsprechende Polypeptide erhalten. Weist ein solches Faktor X-Analogon gegebenenfalls zusätzlich ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich des  $\beta$ -Peptids auf, so werden

Faktor Xa $\beta$ -homologe Moleküle gewonnen. Wird jedoch ein Faktor X-Analogon eingesetzt, das Modifikation(en) innerhalb der  $\beta$ -Peptidsequenz aufweist, die dazu führt(en), daß das  $\beta$ -Peptid nicht abgespalten wird, so wird ein Faktor Xa $\alpha$ -Analogon mit einem Aminosäureaustausch im C-Terminus des Moleküls erhalten.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga weisen ausschließlich Modifikationen auf, die die Spezifität für die Aktivierbarkeit ändern und nicht die Aktivität beeinflussen. Es werden daher in jedem Fall biologisch und funktionell aktive Faktor Xa-Moleküle bzw. Faktor Xa-Analoga gewonnen.

Die Aktivierung in vitro kann durch eine Protease ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen erfolgen. Es liegt jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, jede beliebige Protease, außer RVV, Trypsin, Faktor IXa oder Faktor VIIa einzusetzen, sofern sie geeignet ist, das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon zu Faktor Xa zu prozessieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält das Faktor X-Analogon eine Modifikation, die eine Aktivierung des Faktor X-Analogon zu Faktor Xa, vorzugsweise nativem Faktor Xa, in vivo erlaubt. "Nativer" Faktor Xa bedeutet in diesem Zusammenhang, daß der aktivierte Faktor Xa, abgeleitet vom erfindungsgemäßen Faktor X-Analogon, die dem nativem Faktor Xa entsprechende und homologe Aminosäuresequenz aufweist und Faktor Xa-Aktivität besitzt. Die Modifikation ist dabei so gewählt, daß eine Prozessierung von Faktor X zu Faktor Xa durch eine in vivo, also im Körper vorkommende Protease, vorzugsweise eine in der Blutgerinnungskaskade vorkommende Protease erfolgt. Die Protease kann dabei eine Protease ausgewählt aus der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa oder Kallikrein sein. Faktor X-Analoga, die neben der Modifikation im Aktivierungspeptid eine Modifikation im C-terminalen Bereich des Faktor X-Moleküls aufweisen, werden, wie oben beschrieben, auch in vivo in die entsprechenden Faktor Xa-Analoga

aktiviert.

Obwohl beispielsweise von Wolf et al. (1991, J. Biol. Chem. 266: 13726-137309) vermutet wurde, daß eine Endopeptidase wie Kex2, Furin oder PACE an der Prozessierung der von dieser Gruppe beschriebenen Faktor Xa-Deletionsmutante beteiligt ist, geben sie keinerlei Hinweise über den Einfluß einer dieser Proteasen bei der Prozessierung von Faktor X. Ebenso wird in der US 5,660,950 die rekombinante Herstellung von PACE und die Verwendung der Protease zur Verbesserung der Prozessierung von Vitamin-K abhängigen Proteinen beschrieben. In einer Reihe von Aufzählungen mit anderen Blutfaktoren wird auch Faktor X genannt, wobei jedoch diese Aussage verifizierende Daten fehlen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde zum erstenmal eindeutig gezeigt, daß eine der für den Reifungsprozeß von Faktor X notwendige Protease eine bibasische Endoprotease, insbesondere endogen vorkommendes Furin, ist. In vivo vermittelt die Endoprotease in erster Linie die Spaltung des einzelkettigen Faktor X-Moleküls in die reife Form bestehend aus schwerer und leichter Kette. In vitro vermittelt sie zusätzlich die Abspaltung der Faktor X Propeptid-Sequenz (Beispiel 2).

Erfindungsgemäße Faktor X-Analoga, die eine Proteasespaltstelle für eine nicht-natürlicherweise in einer Zelle vorkommende Protease aufweisen, werden durch selektive Prozessierungsreaktion nur an den Stellen gespalten, die auch im nativen Faktor X gespalten werden. Dadurch wird rekombinantes Faktor X-Molekül erhalten, das lediglich aus der 22 kD leichten Kette und der ca. 50 kD schweren Kette besteht und nicht durch unspezifische Prozessierung auftretende inaktive Faktor X-Moleküle aufweist. Diese modifizierten Faktor X-Moleküle werden, ebenso wie die nativen Faktor X-Moleküle, nicht durch die intrazelluläre Protease zu Faktor Xa aktiviert. Sie werden erst anschließend durch die entsprechenden Proteasen (vorzugsweise Serinproteasen oder Subtilisin-verwandte Proteasen) zu Faktor Xa aktiviert.

Gemäß einer Ausführungsform wird daher ein zweikettiges Faktor X-Analogon zur Verfügung gestellt.



Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden Faktor X-Analoga bereitgestellt, die vorzugsweise in gereinigter Form als einzelkettige Moleküle vorliegen. Durch Expression von Faktor X-Analogen in einer für eine bibasische Protease defizienten Zelle, wird pro-Faktor X als einzelkettiges Molekül erhalten. Das einzelkettige Faktor X-Molekül zeichnet sich durch seine hohe Stabilität und molekulare Integrität aus. Bisher konnte ein einzelkettiges Faktor X-Molekül nicht in gereinigter Form isoliert werden, da es sehr rasch in die zweikettige Form prozessiert wird (Fair et al., 1984, Blood 64:194-204). Die rekombinanten einzelkettigen Faktor X-Analoga können durch spezifische Prozessierung in die zweikettige Faktor X-Form prozessiert und anschließend zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogen aktiviert werden. Dies kann dadurch erfolgen, daß ein aus einer Protease-defizienten Zelle isoliertes einzelkettiges rekombinantes Faktor X-Molekül mit einer bibasischen Protease, wie Furin/PACE oder Kex2 in Kontakt gebracht wird und in zweikettiges Faktor X-Analogen prozessiert wird.

Zweikettiges Faktor X-Analogen kann zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogen aktiviert werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß ein Faktor X-Analogen, das durch eine Modifikation in Bereich des Aktivierungspeptids eine Furin-spezifische Spaltstelle aufweist, aus einer Furin-defizienten Zelle als einzelkettiges Molekül isoliert und anschließend durch in Kontakt bringen mit einer Endoprotease in ein aktiviertes Faktor Xa-Molekül prozessiert wird.

Ebenso kann ein isoliertes, einzelkettiges Faktor X-Analogen, das eine Modifikation im Aktivierungspeptid aufweist, die eine alternative Prozessierung durch eine Protease aus der Gruppe der Serinproteasen oder Kallikrein ermöglicht, erst durch Behandlung einer bibasischen Endoprotease, wie etwa Furin, in ein zweikettiges Faktor X-Molekül gespalten und dieses im weiteren Verlauf mit einer Serinprotease derart in Kontakt gebracht werden, daß eine Aktivierung zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogen erfolgt.

Ein als zweikettiges Molekül aus einer Zellkultur isoliertes Faktor X-Analogen kann direkt mit der für die Aktivierung spezi-

- 16 -

fischen Protease behandelt werden.

Ein derart erhaltener Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon weist aufgrund der selektiven und gerichteten Prozessierungsreaktion eine hohe Stabilität und strukturelle Integrität auf und ist insbesondere frei von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die rekombinante DNA kodierend für die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga. Die rekombinante DNA resultiert nach Expression in einem Faktor X-Analogon mit einer Aminosäuresequenz entsprechend dem humanen Faktor X, außer daß es eine Modifikation aufweist, die die Prozessierungsspezifität und Prozessierungsprodukte beeinflusst, wogegen die biologische Koagulans-Aktivität im wesentlichen unbeeinflusst bleibt.

Gemäß einem weiteren Aspekt werden auch transformierte Zellen enthaltend die rekombinante DNA zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Präparation enthaltend ein gereinigtes Faktor X-Analogon oder ein Vorläuferprotein davon, das eine Modifikation im Bereich der natürlicherweise vorkommenden Faktor Xa-Aktivierungsstelle aufweist. Die Modifikation im Bereich der Aktivierungsspaltstelle ist eine neue, nicht-natürlicherweise an dieser Position im Polypeptid vorkommende Erkennungs- bzw. Spaltstelle für eine Protease, die das Polypeptid normalerweise nicht an dieser Stelle prozessiert. Die Präparation kann dabei eine gereinigte Präparation von einzelkettigem oder zweikettigem Faktor X-Analogon sein, wobei die Polypeptide aus einem Zellkultursystem entweder nach Isolierung aus dem Zellkulturüberstand oder aus einem Extrakt einer Zellkultur erhalten werden. Ein aus einem Zellkultursystem vorgereinigtes rekombinantes Faktor X-Analogon kann über aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren weiter gereinigt werden. Dazu eignen sich insbesondere chromatographische Verfahren, wie Gel-filtration, Ionenaustauscher- oder Affinitätschromatographie.

Gemäß einer Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präpä-

- 17 -

ration das Faktor X-Analogon vorzugsweise als einzelkettiges Molekül in isolierter Form. Eine derartige Präparation wird dadurch hergestellt, daß ein durch rekombinante Herstellung gewonnenes Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül aus einem Zellsystem, vorzugsweise einer Zellkultur von Zellen, denen die Endoprotease fehlt, welche die Einzelkette in schwere und leichte Kette spaltet.

Gemäß einem besonderen Aspekt enthält die Präparation einzelkettiges Faktor X-Analogon mit einer Modifikation, die eine Aktivierung zu Faktor Xa durch eine der Proteasen, ausgewählt aus der Gruppe der bibasischen Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 in vitro erlaubt. Die Aktivierung erfolgt dabei durch In-Kontakt-bringen des Faktor X-Analogons mit der Protease, wobei aufgrund der natürlich vorkommenden Prozessierung eine Spaltung in die mature Faktor X-Form und durch die Modifikation eine Abspaltung des Aktivierungspeptids erfolgt und Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon entsteht.

In der erfindungsgemäßen Präparation kann das Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül entweder als Faktor X $\alpha$  (FX $\alpha$ ) oder mit einer Deletion des  $\beta$ -Peptids vorliegen. Die Präparation enthält insbesondere Faktor X-Analogon in enzymatisch inaktiver Form mit einer Reinheit von mindestens 80 %, vorzugsweise 90 %, besonders bevorzugt von 95 %, und enthält keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präparation das Faktor X-Analogon vorzugsweise als zweikettiges Molekül in isolierter Form. Dazu wird beispielsweise ein durch rekombinante Herstellung als einzelkettiges Molekül aus einem Zellsystem gewonnenes Faktor X-Analogon in vitro, also außerhalb der Zelle, durch eine Protease, vorzugsweise eine bibasische Protease, in die zweikettige Form gespalten. Dies kann dadurch erfolgen, daß die Protease direkt mit dem Kulturüberstand der Faktor X-Analogon exprimierenden Klone gemischt wird, entweder durch Mischen der gereinigten Protease oder eines Zellkulturüberstandes einer die Protease in rekombinanter Form

exprimierenden Zellkultur, oder durch Co-Kultivierung von Faktor X-Analogon und Protease-exprimierenden Klonen.

Ebenso kann der Zellkulturüberstand, enthaltend das Faktor X-Analogon oder das gereinigte Faktor X-Analogon, mit einer immobilisierten Protease in Kontakt gebracht werden, wobei eine Prozessierung in die zweikettige Form stattfindet. Bei diesem Verfahren ist die Protease vorzugsweise an eine Matrix gebunden und der Zellkulturüberstand oder eine gereinigte Präparation enthaltend das Faktor X-Analogon wird über diese Matrix geleitet. Jedoch ist auch die Immobilisierung des Faktor X-Analogons denkbar, während die Protease in der mobilen Phase ist. Ebenso können die Reaktanden (Faktor X-Analogon und Protease) gemischt und über einen bestimmten Zeitraum inkubiert werden. Die Protease wird anschließend aus dem Gemisch, beispielsweise durch Affinitätschromatographie entfernt.

Die zweikettige Form des Faktor X-Analogons kann auch durch Co-expression der Protease und des Faktor X-Analogon direkt in einer gegebenen Zelle gewonnen und gegebenenfalls gereinigt werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung enthält die Präparation ein einzelkettiges oder zweikettiges Faktor X-Analogon mit einer Modifikation, die eine Aktivierung zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon in vitro erlaubt. Die Aktivierung von Faktor X-Analogon zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon kann dabei erfolgen durch In-Kontakt-bringen des Faktor X-Analogons mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der bibasischen Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor IIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen. Die Protease kann dabei an einen Träger immobilisiert sein.

Die erfindungsgemäße Präparation kann als Ausgangsmaterial zur Herstellung und Gewinnung von Faktor Xa dienen. Dazu wird in einem großtechnischen Ansatz die Präparation, enthaltend einzelkettiges oder zweikettiges Faktor X-Analogon, beispielsweise

- 19 -

mit einer, gegebenenfalls immobilisierten, Protease unter Bedingungen, die eine optimale Aktivierung von Faktor X-Analogen zu Faktor Xa erlauben, in Kontakt gebracht und Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogen erhalten. Der so gewonnene Faktor Xa/-Analogen kann anschließend über allgemein bekannte Methoden zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert werden.

Gemäß einer besonderen Ausführung enthält die Präparation, enthaltend das gereinigte, einzelkettige oder zweikettige Faktor X-Analogen, einen physiologisch akzeptablen Träger und ist gegebenenfalls als pharmazeutisches Präparat formuliert. Die Formulierung kann in an sich üblicher Weise erfolgen und mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, CaCl<sub>2</sub>, und Aminosäuren, wie Glycin und/oder Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert sein. Die gereinigte Präparation enthaltend Faktor X-Analogen kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bis zum Endgebrauch als lagerfähiges Produkt bereitgestellt werden. Vorzugsweise erfolgt die Lagerung der Präparation in lyophilisierter Form und wird mit einer entsprechenden Rekonstitutionslösung in eine optisch klare Lösung gelöst.

Die Präparation gemäß der vorliegende Erfindung kann jedoch auch als Flüssigpräparat bzw. in flüssig-tiefgefrorener Form zur Verfügung gestellt werden. Die erfindungsgemäße Präparation ist besonders stabil, d.h. sie kann auch in gelöster Form über längere Zeit vor der Applikation stehen gelassen werden. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation für mehrere Stunden bis Tage keinerlei Aktivitätsverlust zeigt.

Die erfindungsgemäße Präparation kann in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, in Kombination mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, vorliegen.

Die erfindungsgemäße Präparation enthaltend ein Faktor X-Ana-

logon in Kombination mit einer Protease, die in der Lage ist, das Faktor X-Analogon zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon zu aktivieren, kann als Kombinationspräparat bereitgestellt werden, bestehend aus einem Behälter enthaltend eine an einen Träger immobilisierte Protease, gegebenenfalls in Form einer Mini-Säule oder einer mit einer Protease bestückten Spritze und einem Behälter enthaltend die pharmazeutische Präparation mit Faktor X-Analogon. Zur Aktivierung des Faktor X-Analogons wird die Faktor X-Analogon-haltige Lösung beispielsweise über die immobilisierte Protease gedrückt. Die Faktor X-Analogon-haltige Lösung ist dabei während der Lagerung des Präparates vorzugsweise von der Protease räumlich getrennt. Die erfindungsgemäße Präparation kann im gleichen Behälter wie die Protease sein, wobei die Komponenten jedoch durch eine impermeable Trennwand, die bei etwai- gem Gebrauch leicht zu entfernen ist, räumlich getrennt sind. Die Lösungen können auch in eigenen Behältern aufbewahrt werden und erst kurz vor Anwendung miteinander in Kontakt geracht werden.

In einer besonderen Ausführungsform ist die zur Aktivierung eingesetzte Protease eine auch natürlicherweise bei der Blutgerinnung beteiligte Serinprotease, wie etwa Faktor XIIa oder Faktor XIa, die vor der Applikation nicht vom aktivierten Faktor Xa abgetrennt werden muß, sondern mit ihr appliziert werden kann.

Die Aktivierung von Faktor X-Analogon zu Faktor Xa kann kurz vor dem direkten Gebrauch, also vor der Applikation am Patienten erfolgen. Die Aktivierung kann durch in Kontakt-bringen mit einer immobilisierten Protease oder durch Mischen von Lösungen, enthaltend einerseits eine Protease und Faktor X-Analogon andererseits, erfolgen. Es ist daher möglich die beiden Komponenten getrennt voneinander in Lösung zu halten und durch eine geeignete Infusionsvorrichtung, bei der die Komponenten während des Durchlaufs in Kontakt kommen, zu mischen und so das jeweilige Molekül zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon zu aktivieren. Dem Patienten wird so ein Gemisch von Faktor Xa und einer weiteren Serinprotease, die die Aktivierung bewirkt hat, verabreicht. Hierbei ist insbesondere auf die Dosierung zu achten, da durch die zusätzliche Gabe einer Serinprotease auch endogener Faktor X akti-

viert wird und damit die Gerinnungszeit verkürzt sein kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die pharmazeutische Präparation in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, entweder in flüssig-gefrorener oder lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Eine geeignete Applikationsvorrichtung kann dabei ein gemäß der AT 366 916 oder der AT 382 783 beschriebener Doppelkammerspritzenkörper sein.

Gemäß einem Aspekt der Erfindung enthält die Präparation ein Faktor X-Analogon mit einer Modifikation, die Aktivierung von Faktor X-Analogon zu einem Faktor Xa in vivo erlaubt. Die Faktor X-Analoga der erfindungsgemäßen Präparation weisen insbesondere eine Modifikation auf, die eine Erkennungsstelle/Spaltstelle für eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein darstellt und werden durch eine der genannten Proteasen in vivo zu nativem Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon gespalten. Dabei sind besonders für den therapeutischen Einsatz solche Faktor X-Analoga von Vorteil, die eine Erkennungs-/Spaltstelle für eine innerhalb der Gerinnungskaskade vom Faktor VIIa/Gewebe-Komplex und dem Tenase-Komplex unabhängige Protease aufweisen. Dadurch kann die erfindungsgemäße Präparation bei der Blutstillung sowohl bei Patienten mit Defizienzen des Faktor IX, des Faktor VII als auch des Faktor VIII eingesetzt werden. Bei Patienten, bei denen eine Störung der Blutgerinnung aufgrund einer Faktor XI- oder Faktor XII-Defizienz auftritt, sollten keine pharmazeutischen Präparationen enthaltend Faktor X-Analogon, die durch Faktor XIIa oder Faktor XIa aktiviert werden, eingesetzt werden. Bei z.B. Faktor XI-Defizienz wäre der Einsatz eines Faktor X-Analogon mit einer Faktor XIIa-Schnittstelle einsetzbar.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung enthält die erfindungsgemäße Präparation gegebenenfalls als weiteren Bestandteil einen Blutfaktor in Form des Zymogens oder einer aktiven Serinprotease. Bevorzugt sind dabei als weitere Bestandteile solche Komponenten mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität. Dazu gehören insbesondere Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor VIII, Faktor V und/oder die aktiven Serinproteasen davon. Weitere Bestand-

- 22 -

teile können jedoch auch Phospholipide, Ca-Ionen u.a. sein. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung enthält die erfindungsgemäße Präparation mindestens eine weitere Komponente mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität.

Die erfindungsgemäße Präparation kann als pharmazeutische Präparation mit Faktor Xa-Aktivität als Einkomponenten-Präparat oder in Kombination mit anderen Faktoren als Mehrkomponentenpräparat zur Verfügung gestellt werden.

Vor der Aufbereitung in eine pharmazeutische Präparation wird das gereinigte Protein den üblichen Qualitätskontrollen unterzogen und in eine therapeutisch verabreichbare Form gebracht. Insbesondere wird bei der rekombinanten Herstellung das gereinigte Präparat auf Abwesenheit von zellulären und vom Expressionsvektor stammenden Nukleinsäuren getestet, vorzugsweise gemäß einem Verfahren, wie es in der EP 0 714 987 beschrieben ist.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines sicheren Präparates die Präparation gegebenenfalls zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Präparation, enthaltend Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, zur Verfügung gestellt, die insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten und dadurch erhältlich ist, daß ein Faktor X-Analogon der oben beschriebenen Art aktiviert und zu einer entsprechenden Präparation zubereitet wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Präparation der oben beschriebenen Art zur Herstellung eines Arzneimittels. Ein Arzneimittel enthaltend ein erfindungsgemäßes Faktor X-Analogon bzw. Faktor Xa-Analogon eignet sich insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, wie etwa Hämophilie-Patienten oder Patienten, welche inhibierende Antikörper gegen die üblicherweise zur Behandlung



eingesetzten Faktor VIII und/oder IX entwickelt haben, und insbesondere als Präparat mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Nukleinsäure enthaltend die kodierenden Sequenzen der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen zur Herstellung eines Arzneimittels. Dabei kann die Nukleinsäure, sofern sie geeignete Expressionskontrollsequenzen enthält, als nackte Nukleinsäure appliziert werden, in einem rekombinanten Expressionsvektor integriert sein oder an einen Träger, entweder ein Phospholipid oder ein virales Partikel gebunden sein. Die Nukleinsäure kann dabei zur Herstellung eines Arzneimittels verwendet werden, das sich insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, wie etwa Hämophilie-Patienten oder Hämophilie-Patienten mit inhibitorischen Antikörpern eignet. Ein Einsatz der Nukleinsäure in der Gentherapie ist ebenfalls denkbar.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen und eine Präparation enthaltend ein erfindungsgemäßes Faktor X-Analogon. Dazu wird eine für ein Faktor X-Analogon kodierende Sequenz in ein geeignetes Expressionssystem eingebracht und entsprechende Zellen, vorzugsweise permanente Zelllinien, mit der rekombinanten DNA transfiziert. Die Zellen werden unter optimalen Bedingungen für die Genexpression kultiviert und Faktor X-Analoge entweder aus dem Extrakt einer Zellkultur oder dem Zellkulturüberstand isoliert. Die Reinigung des rekombinanten Moleküls kann durch alle bekannten chromatographischen Verfahren, wie Anionen- oder Kationenaustauscher-, Affinitäts- oder Immunaффinitätschromatographie, oder einer Kombination davon, weiter gereinigt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen wird die komplette für Faktor X kodierende cDNA in einen Expressionsvektor kloniert. Dies erfolgt entsprechend den allgemein bekannten Klonierungstechniken. Die für Faktor X kodierende Nukleotidsequenz wird anschließend derart modifiziert, daß die kodierende Sequenz im Bereich des Aktivierungspeptids und gegebenenfalls auch im Bereich des C-terminalen  $\beta$ -Peptids derart verändert wird, daß ein Faktor X-Molekül der oben beschriebenen Art hergestellt werden

kann. Dies erfolgt durch aus dem Stand der Technik bekannte gentechnische Methoden, wie spezifische gerichtete in vitro-Mutagenese, oder Deletion von Sequenzen, beispielsweise durch Restriktionsverdau durch Endonukleasen und Insertion anderer, veränderter Sequenzen, oder durch PCR. Die so hergestellten Faktor X-Mutanten werden dann in ein für die rekombinante Expression geeignetes Expressionssystem inseriert und exprimiert.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga können ebenfalls durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Faktor X-Analoga werden vorzugsweise durch rekombinante Expression hergestellt. Die gentechnische Herstellung kann mit allen gängigen Expressionssystemen, wie z.B. permanenten Zelllinien oder viralen Expressionssystemen, erfolgen. Die permanenten Zelllinien werden hergestellt durch stabile Integration der Fremd-DNA in das Wirtszellchromosom von z.B. Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, insbesondere Leber- und Nierenzellen, oder durch einen episomalen Vektor, abgeleitet von z.B. Papilloma Virus. Virale Expressionssysteme, wie beispielsweise Vaccinia Virus, Baculovirus oder retrovirale Systeme können ebenfalls eingesetzt werden. Als Zelllinien werden allgemein Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, Drüsen-, Leber- und Nierenzellen eingesetzt. Als eukaryontische Expressionssysteme können auch Hefen, endogene Drüsen (z.B. Drüsen transgener Tiere) und andere Zelltypen verwendet werden. Natürlich können auch transgene Tiere zur Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Derivaten davon verwendet werden. Zur Expression der rekombinanten Proteine haben sich im speziellen CHO-DHFR<sup>-</sup>-Zellen bewährt (Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:4216-4220).

Zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga können auch prokaryontische Expressionssysteme eingesetzt werden. Hierzu eignen sich insbesondere Systeme, die eine Expression in *E. coli* oder *B. subtilis* erlauben.

Die Faktor X-Analoga werden in den entsprechenden Expressionssystemen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors exprimiert. Im Fall der Expression in Eukaryonten eignen sich dazu

- 25 -

alle bekannten Promotoren, wie SV40-, CMV-, RSV-, HSV-, EBV-,  $\beta$ -Actin-, hGH oder induzierbare Promotoren, wie z.B. hsp- oder Metallothionein-Promotor. Vorzugsweise werden die Faktor X-Analoga unter Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promotors in CHO-Zellen exprimiert.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation die Schritte des Bereitstellens einer für ein Faktor X-Analogon kodierenden DNA, Transformation einer Zelle mit der rekombinanten DNA, Expression des Faktor X-Analogons, gegebenenfalls in Gegenwart einer Protease, Isolieren des Faktor X-Analogons und gegebenenfalls Reinigung über ein chromatographisches Verfahren.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens wird das Faktor X-Analogon als zweikettiges Molekül isoliert. Dazu wird Faktor X-Analogon in einer Zelle exprimiert, die eine Prozessierung von pro-Faktor X-Analogon in zweikettigen Faktor X-Analogon erlaubt. Die Zelle ist dabei vorzugsweise eine Zelle, die eine für die Prozessierung des Faktor X-Vorläufers fähige Protease, etwa eine bibasische Protease, wie Furin oder ein Derivat davon, exprimiert. Gegebenenfalls kann zur Erhöhung bzw. Verbesserung der Prozessierungseffizienz die Zelle derart modifiziert werden, daß sie die Protease verstärkt exprimiert. Dies kann beispielsweise durch Co-Expression einer entsprechenden bibasischen Endoprotease, etwa Furin/PACE, Kex2 oder einem Derivat davon erfolgen. Das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon kann ebenfalls in einer Zelle exprimiert werden, die eine normale oder damit für die Prozessierung suboptimale endogene Konzentration einer Protease aufweist und demzufolge eine unvollständige Prozessierung in die zweikettige Form stattfindet. Die anschließende Prozessierung in schwere und leichte Kette erfolgt in diesem Fall, sofern einkettiges Faktor X-Analogon in den Zellüberstand sezerniert wird, wie oben beschrieben, durch Co-Kultivierung mit Protease-exprimierenden Zellen oder In-Kontakt-bringen mit einer, gegebenenfalls immobilisierten, Protease. Der Zellüberstand kann auch über eine Trägermatrix, an die eine Protease gebunden ist, gepumpt werden, wodurch im Eluat zweikettiges Faktor X-Analogon erhalten wird. Auch können die Reaktanden in Lösung gemischt,

- 26 -

für einen bestimmten Zeitraum inkubiert und anschließend die Protease beispielsweise über eine Affinitätsmatrix entfernt werden.

Das so erhaltene zweikettige Faktor X-Analogon kann anschließend isoliert, gereinigt und bis zur weiteren Verwendung, wie oben beschrieben, stabil gelagert werden.

In einer besonderen Ausführungsform wird zweikettiges, gegebenenfalls gereinigtes Faktor X-Analogon mit einer Protease ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, Faktor IIa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, in vitro Kontakt gebracht wird, unter Bedingungen, unter denen das Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa oder einem Faktor Xa-Analogon aktiviert wird.

Gemäß einer Ausführungsform erfolgt die Aktivierung durch einen chromatographischen Schritt, bei dem die Protease an einen Träger immobilisiert ist. Gereinigtes zweikettiges Faktor X-Analogon wird dazu über eine Matrix, an die die Protease gebunden ist, geleitet und aus dem Eluat gereinigter Faktor Xa isoliert.

Gemäß einer anderen Ausführungsform werden die Komponenten gemischt und die Protease selektiv aus dem Gemisch entfernt.

Es ist natürlich auch eine Kombination von Prozessierung von einzelkettigem pro-Faktor X-Analogon in die zweikettige Faktor X-Analogon-Form und Aktivierung zu Faktor Xa in einem einzigen Verfahren möglich. Einzelkettiges Faktor X-Analogon oder eine Vorstufe davon wird dazu direkt mit einer bibasischen Protease, vorzugsweise Furin oder einem Derivat davon, die eine Prozessierung in schwere und leichte Kette und eine Aktivierung zu Faktor Xa erlaubt, in Kontakt gebracht. Faktor X-Analogon, das keine Spaltstelle für Furin oder einem Derivat davon im Aktivierungspeptid aufweist, wird gegebenenfalls mit einer weiteren, von der ersten verschiedenen Protease, die jedoch eine Aktivierung ermöglicht, in Kontakt gebracht. Die Proteasen können dabei in ei-

ner Mischung, beispielsweise von Furin und Faktor XIa vorliegen.

Die Aktivierung kann auch durch eine Kombination beider Schritte durch nacheinandergeschaltene, miteinander direkt verbundene Vorrichtungen, vorzugsweise von Trägern, wie etwa Säulen, an die die Protease(n) immobilisiert ist (sind), erfolgen. Dabei erfolgt am ersten Träger eine Spaltung von Faktor X in schwere und leichte Kette und am zweiten eine Aktivierung zu Faktor Xa durch die immobilisierte Protease. Eine Kopplung der Träger kann dabei durch direkte Verbindung des Auslaufs der ersten Säule mit dem Einlaß der zweiten Säule erfolgen.

Die Reaktionsbedingungen für die Prozessierungsreaktion(en) und die Aktivierung können ohne weiteres vom Fachmann je nach Versuchsanordnung der gegebenen Rahmenbedingungen optimiert werden. Dabei ist für die Kontaktdauer die Fließgeschwindigkeit der vorliegenden Reaktanden von besonderer Bedeutung. Diese sollte im Idealfall zwischen 0,01 ml/min und 1 ml/min liegen. Als weitere Parameter sind Temperatur, pH-Wert und Elutionsbedingungen von Bedeutung. Nach dem Durchlauf kann aktivierter Faktor Xa gegebenenfalls über selektive Chromatographie weiter gereinigt werden. Die Durchführung des Verfahrens mit jeweils an einen Träger gebundener Protease ist deshalb von besonderem Vorteil, da die Reaktionsanordnung durch Verwendung eines Trägers, vorzugsweise von Chromatographiesäulen, einen zusätzlichen Reinigungsschritt ermöglicht.

Gemäß einem weiteren Aspekt zur Herstellung eines Faktor X-Analogons wird Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert. Dazu wird das Faktor X-Analogon in einer Zelle exprimiert, die die Prozessierung der Einzelkette in eine leichte und eine schwere Kette nicht unterstützt. Die Zelle weist dabei vorzugsweise eine Defizienz einer bibasischen Endoprotease, wie etwa Kexin, Furin, PACE auf. Wie im Rahmen der Erfindung festgestellt wurde, ist eine der wesentlichen für die Spaltung von Faktor X in leichte und schwere Kette verantwortlichen Proteasen Furin. Aus einer solchen Endoprotease-defizienten-Mutanten zelle kann Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert werden. Ein derart isoliertes und gegebenenfalls gereinigtes Faktor

- 28 -

X-Analogon wird anschließend mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, in Kontakt gebracht, unter Bedingungen unter denen einzelkettiges Faktor X-Analogon in die zweikettige Faktor X-Form gespalten wird. Erfindungsgemäße Faktor X-Analoga, die eine Modifikation im Bereich des Aktivierungspeptids aufweisen, die eine Spaltung durch eine dieser Endoproteasen ermöglicht, können durch dieses Verfahren gegebenenfalls direkt durch in Kontakt-bringen mit der Endoprotease von einzelkettigem Faktor X-Analogon zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon aktiviert werden.

Erfindungsgemäße Faktor X-Analoga, die im Bereich des Aktivierungspeptids eine Modifikation aufweisen, die eine Spaltung durch eine Serinprotease oder Kallikrein ermöglicht, werden nach der Herstellung zu zweikettigem Faktor X-Analogon mit einer weiteren, von der ersten verschiedenen Protease in Kontakt gebracht und zu Faktor Xa-Analogon aktiviert.

Gemäß einem Aspekt der Erfindung wird durch das Verfahren eine Präparation enthaltend aktiven Faktor Xa bzw. ein aktives Faktor Xa-Analogon dadurch erhalten, daß, ein wie oben beschrieben hergestelltes, Faktor X-Analogon einem Aktivierungsschritt unterzogen wird und das aktivierte Polypeptid zu einer gereinigten Präparation, die gegebenenfalls als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert ist, weiterverarbeitet wird.

Mit den erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen, die durch einen oben beschriebenen Prozeß zu Faktor Xa aktiviert werden, wird gereinigter Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität und insbesondere frei von inaktiven Faktor X/Xa-Intermediaten, gewonnen.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher beschrieben, wobei sie jedoch nicht auf diese besonderen Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Beispiel 1 beschreibt die Konstruktion und Expression eines rFaktor X; Beispiel 2 beschreibt die Prozessierung von rFaktor X

in schwere und leichte Kette durch Furin; Beispiel 3 beschreibt die Prozessierung von pro-Faktor X mittels immobilisierter Protease; Beispiel 4 beschreibt die Aktivität des in vitro prozessierten rFaktor X; Beispiel 5 beschreibt die Expression von rFaktor X in Furin-defizienten Zellen; Beispiel 6 beschreibt die Konstruktion und Expression von rFaktor X-Analogen; Beispiel 7 beschreibt die Bestimmung der N-Termini der Faktor X-Prozessierungsprodukte. Beispiel 8 beschreibt die Expression und Charakterisierung des FX-Analogen mit der Furin-Spaltstelle Arg-Arg-Lys-Arg/Ile (rFX<sup>RRKR/I</sup>); Beispiel 9 beschreibt die in vitro-Aktivierung des rFX<sup>RRKR/I</sup>-Proteins durch rFurin-Derivate; Beispiel 10 beschreibt die Funktionalität des in vitro aktivierten rekombinanten FX-Analogen rFX<sup>RRKR/I</sup>; Beispiel 11 beschreibt die in vitro-Aktivierung des rFX-Analogen mit der FXIa-Spaltstelle Asp-Phe-Thr-Arg/Val für FXIa.

Es zeigen:

- Figur 1: Nukleotid-und Aminosäuresequenz von Faktor X
- Figur 2: Schematische Darstellung der Faktor X-Analogen mit modifizierten Proteasen-Schnittstellen im Bereich des Aktivierungspeptids
- Figur 3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors phAct-rFX
- Figur 4: Westernblot-Analyse von rFaktor X exprimiert in CHO-Zellen vor und nach Amplifikation
- Figur 5: Westernblot-Analyse von rFaktor X nach in vitro-Spaltung mit Furinderivaten
- Figur 6: Westernblot-Analyse von rFaktor X-Molekülen exprimiert in Furin-haltigen und Furin-defizienten Zellen
- Figur 7: Schematische Darstellung der rFX/rFXa-Analogen-Konstrukte mit veränderten C-Termini der schweren Kette
- Figur 8: Schematische Darstellung der N-Termini der rFaktor X-Prozessierungsprodukte von Furin-enthaltender und Furin-defizienter CHO-Zellen vor und nach Behandlung mit rFurin
- Figur 9: Westernblot-Analyse von rFaktor FX<sup>RRKR/I</sup>, exprimiert in CHO-Zellen
- Figur 10: Westernblot-Analyse von rFaktor FX<sup>RRKR/I</sup> nach in vitro-Aktivierung mit Furinderivat.

- 30 -

Figur 11: Westernblot-Analyse von rFaktor FX<sup>DFTR/V</sup> nach in vitro-Aktivierung mit Furinderivat.

Die Expressionsvektoren wurden mittels Standard-Klonierungstechniken (Maniatis et al., "Molecular Cloning"- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1983) hergestellt. Die Herstellung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte durch allgemeine Methoden (Clackson et al., 1991m, PCR A practical approach. ED. McPherson, Quirke, Taylor, S. 187-214).

#### **B e i s p i e l 1 :**

**Expression und Prozessierung von einzelkettigem rFX zu rFX leichte/schwere Kette**

##### **a. Herstellung des rFX Expressionsvektors**

Zur Herstellung von rekombinantem FX (rFX) wurde die cDNA von FX aus einer humanen Leber Lambda-cDNA-Bank, wie von Messier et al. beschrieben (1991, Gene 99:291-294), isoliert. Aus einem positiven Klon wurde mittels PCR mit Oligonukleotid #2911 (5'-ATTACTCGAGAAGCTTACCATGGGGCGCCCACTG-3') (SEQ. ID. Nr. 1) als 5'-Primer und Oligonukleotid #2912 (5'-ATTACAATTGCTGCAGGGATCCAC-3') (SEQ. ID. Nr. 2) als 3'-Primer ein DNA-Fragment amplifiziert, das die 1,467kB FX-kodierende Sequenz sowie 39bp der 3' nicht-translatierten Region, flankiert von einer XhoI-Schnittstelle, am 5'-Ende und einer MfeI-Schnittstelle am 3'-Ende enthält. Zusätzlich wurde durch den Primer #2911 die Sequenz ACC vor das ATG des FX eingebaut, so daß eine optimale Kozak-Translations-initiations-Sequenz entsteht. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt als XhoI/MfeI-Fragment in den mit SalI und EcoRI geschnittenen Expressionsvektor phAct kloniert. Das resultierende Expressionsplasmid wurde mit phAct-rFX bezeichnet (Figur 3). Der Expressionsvektor phAct umfaßt den humanen beta-Actin-Promoter, 78bp 5'UTR sowie das Intron, eine multiple Klonierungsschnittstelle und die SV40-Polyadenylierungsstelle.

##### **b. Expression von rFX in CHO-Zellen**



- 31 -

Zur Etablierung einer stabilen rFX-exprimierenden Zelllinie wurden dhfr-defiziente CHO-Zellen mit dem Expressionsplasmid phAct-rFX und dem Selektionsmarkerplasmid pSV-dhfr co-transfiziert. Für alle weiteren Expressions- und Funktionsanalysen wurden die Zellkulturen mit serumfreiem Selektionsmedium in Anwesenheit von 10 µg/ml Vitamin K 24 Stunden lang inkubiert. Die Expression von rFX in den resultierenden Zellklonen wurde anhand der Antigenmenge (ELISA, Asserachrom, Boehringer Mannheim) nachgewiesen und das rekombinante Protein anschließend mit SDS-PAGE charakterisiert (Figur 4 A und B). In den Initialklonen und Subklonen davon liegt, wie im Western Blot erkennbar (Figur 4 A), das rekombinante FX-Protein in der Form einer leichten Kette (LC) von 22kD und einer schweren Kette (HC) von ca. 50 kD vor, die identisch mit dem plasmatischen Faktor X-Protein sind. Zusätzlich ist eine Proteinbande bei 75kD zu erkennen, die dem einzelkettigen (SC) Molekül entspricht und deren Präsenz in FX-transfizierten CHO-Zellen (Wolf et al., J. Biol. Chem. 266:13726-13730, 1991) sowie in humanem Plasma (Fair et al., Blood 64:194-204, 1984) beschrieben wurde. Zur Herstellung von hochexprimierenden Klonen wurden die Initialklone mit steigenden Mengen Methotrexat amplifiziert und anschließend bis zur Stabilisierung subkloniert. Die Expression konnte von ca. 200-500 ng/10E6 Zellen bzw. 1 µg/ml auf 78 µg/10E6 Zellen bzw. 120 µg/ml pro 24 Stunden gesteigert werden. Die Western Blot-Analyse dieser hochexprimierenden Zellklonüberstände (Figur 4 B und Figur 5 A Spur 2) zeigt eine Anreicherung des einzelkettigen rFX-Moleküls sowie die Anwesenheit zusätzlicher Formen der leichten Kette. Neben der 22kD-Form der leichten Kette, die der plasmatischen Form entspricht (vollständig carboxyliert und ohne Propeptid) liegen drei weitere Varianten der leichten Kette mit ca. 21kD, 22,5kD und 20kD vor. Die Heterogenität der leichten Kette in diesen Klonen konnte mittels einer N-terminalen Sequenzierung des rekombinanten Materials auf eine unvollständige Abspaltung des Propeptids (hier: ca. 50 % des rFX Materials) sowie auf Unter-carboxylierung (hier: ca. 50 % des rFX) zurückgeführt werden. Das 21kD-Protein ist eine untercarboxylierte Propeptid-haltige und das 20kD-Protein eine untercarboxylierte Propeptid-freie Form der leichten Kette, während die 22,5 kD-Bande die vollständig carboxylierte, jedoch Propeptid-haltige LC-Form repräsen-

tiert.

### **B e i s p i e l 2 :**

**Prozessierung von einzelkettigen rFX in rFX leichte/schwere Kette durch rFurin-Derivate**

Aufgrund der Ähnlichkeit der Spaltstellen zwischen Faktor X Propeptid/N-Terminus der leichten Kette (RVTR+A) und zwischen leichter/schwerer Kette (RRKR+S) mit der Furin-Konsensus-Erkennungssequenz (RXK/RR+X) bestand die Möglichkeit, die Prozessierung sowohl einzelkettiger als auch Propeptid-haltiger rFX-Moleküle durch rFurin-Derivate in vitro zu verbessern. In der Literatur werden für die beiden Prozessierungsschritte Proteasen vermutet, bei denen es sich jedoch nicht um Furin handelt (Rehemtulla et al., 1992, Blood 79:2349-2355; Wallin et al., 1994, Thromb. Res. 1994: 395-403).

Zellkulturüberstände von CHO-rFX und CHO-rFurin  $\Delta$ TM6xHis (Patentanmeldung EP 0 775 750 A2) sowie CHO-rFX und nicht-transfizierter CHO (als Negativkontrolle) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 37°C inkubiert. Aliquote der Reaktionsansätze wurden vor Inkubation (t=0) und nach verschiedenen Inkubationszeiten (t=2, 4, 6 Stunden) mittels Western Blot-Analyse auf prozessierten rFX getestet (Figur 5). Der Nachweis von rFX in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels eines anti-humanen FX Antiserums (Figur 5 A) bzw. eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für die leichte Kette des FX (Figur 5 B).

Im Gegensatz zu dem CHO-rFX/CHO-Gemisch weist das CHO-rFX/CHO-rFurin schon nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C (Figur 5 A Spur 7; Figur 5 B Spur 8) eine fast vollständige Prozessierung auf. Einzelkettiger rFX ist zum Großteil in die leichte und schwere Kettenform umgesetzt. Im Bereich der leichten Kette wurden nur noch die prozessierten Propeptid-freien Formen von 22kD (carboxylierte Form) und 20kD (untercarboxylierte Form) in einem Verhältnis von ca. 50:50 gefunden. Durch Optimieren der Zellkulturbedingungen kann dieses Verhältnis zugunsten der carboxylierten Form verbessert werden. Die korrekte Abspaltung der Pro-Sequenz zwischen Arg-1 und Ala+1 und die Homogenität des N-Termini-

- 33 -

nus der leichten Kette wurde mittels N-terminaler Sequenzierung festgestellt. Im Kontrollexperiment, in dem CHO-rFX mit CHO-Überständen gemischt wurde, ist auch nach einer 6-stündigen Inkubation keine Veränderung des rFX-Bandenmusters zu erkennen (Fig. 5A, Spur 5; Fig. 5B, Spur 6). Damit wurde nachgewiesen, daß rFurin im Überstand von CHO-Zellen biologisch aktiv ist und sowohl die Prozessierung des Propeptids als auch der schweren/leichten Kette von rFX durchführen kann.

### **B e i s p i e l 3 :**

#### **Prozessierung von Faktor X mittels an Chelat-Tentakelgel-immobilisiertem rFurin**

Um festzustellen, ob ein Substrat durch ein Säulen-gebundenes rFurin-Derivat gespalten werden kann, wurde untersucht, ob als Säulen-Matrix statt  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose in einem experimentellen Ansatz Fractogel EMD®-Tentakelgel (Fa. Merck) verwendet werden kann. Da die Metallionen hierbei im Vergleich zur  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose räumlich weiter von der eigentlichen Säulen-Matrix entfernt sind, könnte eine verbesserte sterische Zugänglichkeit des Substrats zum gebundenen rFurin-Derivat ermöglicht werden. In dem vorliegenden Ansatz wurde Pro-Faktor X durch Tentakelgel gebundenes rFurin-Derivat prozessiert: Das Fractogel EMD®-Tentakelgel wurde nach Herstellervorschrift mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladen und mit frischem Serum-freiem Zellkulturmedium equilibriert. Anschließend wurde die Säule mit Serum-freiem CHO-rFurin-Derivat-Überstand beladen. Waschschriffe erfolgten durch Serum-freies Zellkulturmedium, enthaltend steigende Imidazol-Konzentrationen bis 40mM. Anschließend wurde Pro-Faktor X als Serum-freier CHO-Überstand über die Säule geleitet. Mittels Western Blot-Analyse mit spezifischem Faktor X-Antiserum wurde die Prozessierung von Pro-Faktor X zu zweikettigem Faktor X im Durchfluß der Säule nachgewiesen.

### **B e i s p i e l 4 :**

#### **Aktivität des in vitro prozessierten rekombinanten Faktor X**

Rekombinanter Faktor X-Vorläufer wurde mit und ohne rFurin bei 4°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen

- 34 -

und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Nach Abschluß der Inkubation (nach 4 Tagen) wurden alle Proben mittels FX-Coatest Kit (Fa. Chromogenix) auf FX-Aktivität getestet. Dazu wurden  $50\text{ }\mu\text{l}$  von jedem Überstand mit  $50\text{ }\mu\text{l}$  FX-defizientem, humanen Plasma versetzt und laut Protokoll des Herstellers rFX mit Schlangengift (RVV) in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  zu rFXa umgesetzt; rFXa hydrolysiert anschließend das chromogene Substrat (S-2337) und führt zur Freisetzung des gelbfarbigen Paranitroanilin. Da die Menge an rFXa und die Farbintensität proportional zueinander sind, kann anhand einer Eichgerade, interpoliert aus Werten einer Plasma-Verdünnungsreihe, die Menge zu rFXa aktivierbarem rFX/ml Zellkulturüberstand bestimmt werden. Mit diesen Ergebnissen und der bekannten rFX-Antigenmenge (ELISA-Daten) kann der Anteil von zu Faktor Xa aktiviertem rFaktor X in % ausgerechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Um unspezifische, proteolytische Aktivität in CHO- und CHO-rFurin-Überständen auszuschließen, wurde das Gemisch dieser beiden Zellkulturüberstände ebenso untersucht.

CHO-rFX inkubiert mit CHO-Überständen (ohne rFurin) als Kontrolle zeigte auch nach 4 Tagen keine wesentliche Änderung der rFXa-Aktivität, die aufgrund der experimentellen Schwankungen bei etwa  $800\text{ mU/ml}$  lag und  $55\%$  -  $61\%$  funktionellem rFX entsprach. Wurde im Vergleich dazu CHO-rFX mit CHO-rFurin inkubiert, so entstand während der Inkubationszeit eine konstante Steigerung der rFX-Aktivität, die von etwa  $61\%$  (Zeitpunkt  $T=0$ ) auf  $86\%$  stieg (Tabelle 1).

Damit wurde nachgewiesen, daß durch in vitro Prozessierung von CHO-rFX aus hochexprimierenden Klonen mittels rFurin-Derivat der Anteil von zu funktionellem rFXa aktivierbaren rFX wesentlich verbessert wird.

Tabelle 1

	Inkubation in Tagen	Aktivität in mU	Antigen Menge in $\mu\text{g/ml}$	Funktioneller Anteil an rFX in %
CHO-rFX+ CHO	0	814	14	58
	1	847	14	61
	2	835	14	60
	3	790	14	56
	4	763	14	55
CHO-rFX+ CHO-rFurin	0	853	14	61
	1	1018	14	73
	2	1099	14	79
	3	1135	14	81
	4	1198	14	86
CHO + CHO-rFurin		0		
Plasma FX 500mU		585		

**Beispiel 5 :****Expression von rekombinantem Faktor X in Furin-defizienten Zellen**

Wie in den vorangegangenen Beispielen gezeigt, wird bei dem Faktor X-Vorläuferprotein sowohl die Propeptid-Abspaltung als auch die Spaltung der Einzelkette zu leichter/schwerer Kette in vitro durch Furin vermittelt. Dies legt nahe, daß diese Schritte auch in der Zelle endogen durch das ubiquitär vorkommende Furin, abhängig von der jeweilig exprimierten rFaktor X-Menge mit unterschiedlicher Effizienz, bewerkstelligt werden. Dies wiederum führt zur Produktion einer Mischung heterogener rFaktor X-Formen.

Eine Möglichkeit, um eine möglichst homogene und zudem stabile Form von rFaktor X-Molekülen zu erzeugen, ist die Spaltung von rFaktor X durch endogene Proteasen, insbesondere Furin, zu unterbinden und somit funktionell inaktiven rFaktor X-Vorläufer (welcher durch spätere Downstream-Prozessierung, idealerweise direkt vor Verwendung, in seine funktionell aktive Form umgewandelt werden kann) zu produzieren.

- 36 -

Dieses Verfahren wird speziell bei der Erzeugung von FX-Analogen, die eine Furin-Spaltstelle anstatt der ursprünglichen Aktivierungsstelle enthalten, nützlich sein. Bei diesen Konstrukten kann die Aktivierung solch einer rekombinanten rFX-Mutante in vivo durch das endogene Furin stattfinden und zur Sekretion von aktivierten instabileren rFX-Formen führen. Die Degradation dieser Formen, durch CHO-Proteasen, z.B. in Zellkulturbedingungen mit hoher Zelllyse, während der Lagerung der Zellkulturüberstände oder dem Reinigungsverfahren oder durch Autoproteolyse, könnte zu inaktiven Abbauprodukten führen (Wolf et al., 1991).

Dieses Ziel kann z.B. durch Supplementieren des Zellkulturmediums mit Agentien, das die intrazelluläre Furin-Aktivität reduzieren bzw. ausschalten kann, erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist, a priori Furin-defiziente Zellen zu verwenden (Möhrling et al., 1983, Infect. Immun. 41:998-1009; Ohnishi et al., 1994, J. Virol. 68:4075-4079; Gordon et al., 1995, Infect. Immun. 63:82-87).

Hierfür wurde ein Furin-defizienter CHO-Zellklon FD11 (Gordon et al., 1995, Infect. Immun. 63:82-87) mit 20 µg phAct-FX und 1 µg pUCSV-neo (enthaltend das Neomycin-Resistenzgen im pUC-Vektor unter der Kontrolle des SV40-Promotors) co-transfiziert. Um stabile Klone zu erhalten, wurde das Medium mit 0,8 µg G418/ml supplementiert. Bei Vergleich sezernierter rFaktor X-Moleküle in serumfreien Überständen eines Furin-haltigen und eines Furin-defizienten CHO-Klons zeigt sich im Westernblot, daß in den Furin-defizienten Zellen rFaktor X-Vorläufer-Prozessierung unterbleibt und nur einzelkettiger Faktor X-Vorläufer vorliegt (Fig. 6); im Gegensatz dazu wird rFaktor X von "normalen" Zellen bei modester Expression noch vollständig, jedoch bei höherer Expression, trotz endogenem Furin, nur noch sehr beschränkt prozessiert. Aufgrund des geringen rFX-Expressionsgrades des verwendeten Zellklons ist die leichte Kette von rFaktor X im Blot hier nicht zu sehen.

- 37 -

**Beispiel 6 :**

**Herstellung von Faktor X-Analogen (derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der Erfindung)**

**6.1. Konstruktion von Expressionsplasmiden zur Herstellung von Faktor X-Analogen**

Zur Herstellung von rekombinanten rFaktor X-Analogen wurde die Spaltstelle Asn-Leu-Thr-Arg/Ile (Aminosäure 231 bis 235) die zur Aktivierung des Faktor X in Faktor Xa dient, durch eine Spaltstelle spezifisch für eine andere Protease, wie Furin, FXIa, FXa, FXIIa, FIIa, oder Kallikrein ersetzt. Die Expressionsplasmide für diese Faktor X-Analogen sind alle vom Plasmid phAct-FX (beschrieben in Beispiel 1) abgeleitet.

Um die Klonierung der Faktor X-Expressionsplasmide zu vereinfachen, wurde das HindIII-NaeI DNA-Fragment aus dem phAct-FX-Expressionsplasmid, das die Faktor X-kodierende Region von Position +1 bis +1116 umfaßt, in die HindIII/SmaI-Restriktionsschnittstellen von Plasmid pUC19 inseriert. Das resultierende Plasmid wurde mit pUC/FX bezeichnet.

Dadurch konnte die Faktor X-Sequenz von Nucleotid an Position 508 bis 705 (Aminosäure 160 bis 235) aus dem pUC/FX-Plasmid leicht entfernt und durch verschieden mutierte Faktor X DNA-Fragmente ersetzt werden. Diese DNA-Fragmente sind mit der deletierten Wildtyp Faktor X-Sequenz identisch, außer den Positionen 691 bis 705 (Aminosäure 231 bis 235), die für neue Spaltstellen kodieren.

Die Wildtyp Faktor X-Sequenz wurde aus dem pUC/FX-Plasmid über Bsp120I- und BstXI-Restriktionsschnitte entfernt. Der 3'-Überhang der BstXI-Stelle wurde zusätzlich mit Mung Bean-Nuclease (Biolab) entfernt.

Die mutierten Faktor X DNA-Fragmente wurden mittels PCR hergestellt. Der 5'-Primer ist identisch für alle Klonierungen und enthält die Faktor X-Sequenz von Position 496 bis 516. Die 3'-Primers enthalten eine Faktor X-komplementierende Sequenz

(Position 676 bis 690) und einen nicht-komplementierenden 5'-Überhang, der die Sequenzen für eine neue Spaltstelle und eine Restriktionsschnittstelle trägt. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde anschließend mit dem (den) entsprechenden Restriktionsenzym(en) nachgeschnitten und in den vorbereiteten pUC/FX-Vektor (siehe oben) kloniert.

Anschließend wurden die mutierten Faktor X DNA-Fragmente über HindIII-AgeI aus den pUC/FX-Plasmiden in den phAct-FX-Vektor umkloniert. Die Endkonstrukte sind in Figur 2.1 und 2.2 schematisch dargestellt. Als Referenzkonstrukt ist Faktor X-Wildtyp angegeben. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben, die mutierten Positionen sind zusätzlich schattiert.

Zur Herstellung einer Asp-Phe-Thr-Arg/Val FXIa-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1002 (5'-ACCA GTT AAC CCT GGT GAA GTC GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 4) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Ile an den Positionen 231, 232 und 235 der Faktor X-Sequenz in Asp, Phe und Val ersetzt. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und HpaI nachgeschnitten (Fig. 2 A).

Zur Herstellung einer Arg/Ser FIIa-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1003 (5'-ACCA TCG CGA CCT GGT CAG GTT GTT GTC-3') (SEQ. ID. Nr. 5) benutzt. Daher wurde die Aminosäure Ile an den Positionen 235 in Ser mutiert. Das PCR-Fragment wurde über Bsp120I und NruI nachgeschnitten (Fig. 2 B).

Zur Herstellung einer Ile-Lys-Pro-Arg/Ile FXIIa-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1004 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT GGG TTT GAT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 6) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an den Positionen 231, 232 und 233 der FX-Sequenz in Ile, Lys und Pro mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig 2 C).



- 39 -

Zur Herstellung einer Ser-Met-Thr-Arg/Ile Kallikrein-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1005 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT GGT CAT GCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 7) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu an den Positionen 231, 232 der Faktor X-Sequenz in Ser, Met mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 D).

Zur Herstellung einer Pro-Gln-Gly-Arg/Ile FXa-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1016 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TCC TTG GGG GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 8) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an den Positionen 231, 232 und 233 des FX-Proteins in Pro, Gln und Gly mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 H).

Zur Herstellung einer Met-Lys-Thr-Arg/Ile FXa-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1014 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT CGT TTT CAT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 9) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu an den Positionen 231, 232 des FX-Proteins in Met, Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 E).

Zur Herstellung einer Ile-Glu-Gly-Arg/Ile FXa-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1015 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TCC CTC GAT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 10) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu, Thr an den Positionen 231 bis 233 des FX-Proteins in Ile, Glu, Gly mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 F).

Zur Herstellung einer Arg-Arg-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonuc-

- 40 -

leotid #1006 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TTT CCT CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 11) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an Position 231 bis 233 in Arg, Arg und Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Val-Arg-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1007 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT CCT CAC CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 12) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an Position 231 bis 233 in Arg, Val und Arg mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Arg-Arg-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1008 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT CCT CCT CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 13) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an Position 231 bis 233 in Arg, Arg und Arg mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Pro-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1009 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TTT GGG CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 14) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an Position 231 bis 233 in Arg, Pro und Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Ile-Arg-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1010 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TTT CCT GAT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 15) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an Position 231 bis 233 in Ile, Arg und

- 41 -

Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Ser-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1011 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TTT GCT CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 16) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu und Thr an Position 231 bis 233 in Arg, Ser und Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Val-Thr-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1012 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT GGT CAC CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 17) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu an Position 231, 232 in Arg, Val mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Arg-Leu-Lys-Arg/Ile Furin-Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1013 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT TTT GAG CCT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 18) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn und Thr an Position 231 und 233 in Arg und Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bsp120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 G).

Zur Herstellung einer Thr-Ser-Thr-Arg/Ile FXIIa- Spaltstelle wurden als 5'-Primer das Oligonucleotid #1001 (5'-CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT-3') (SEQ. ID. Nr. 3) und als 3'-Primer das Oligonucleotid #1017 (5'-ACC AGA ATC GAT TCT CGT GCT CGT GTT GTC GCC CCT CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 19) benutzt. Daher wurden die Aminosäuren Asn, Leu an den Positionen 231, 232 des FX-Proteins in Ile, Lys mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit Bst120I und XmnI partiell nachgeschnitten (Fig. 2 I).

## 6.2. Konstruktion von Expressionsplasmiden für die Herstellung von FX $\beta$ -Analogon.

Diese Konstrukte wurden von den oben beschriebenen Faktor X-Analogon-Konstrukten abgeleitet, indem ein TGA-Stopcodon an Position 470 eingebaut wurde. Dazu wurden die Aminosäuren von Position 457 auf cDNA-Level bis zum Stopcodon durch SpeI und partiellen BstEII-Verdau entfernt und mit dem Oligonucleotidpaar #0003 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG TGA A-3') (SEQ. ID. Nr. 20) und #0004 (5'-CTA GTT CAC CTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEQ. ID. Nr. 21) ersetzt. Eine schematische Darstellung der Faktor X $\beta$ -Analogon-Konstrukte ist in Fig. 7 gezeigt. Zur Vereinfachung der Abbildung wurden alle Faktor X $\beta$ -Analoge als ein allgemeines Konstrukt dargestellt, in dem die variablen Aminosäuren in der Spaltstellenregion als schattiertes "X" angegeben sind.

## 6.3. Konstruktion von Expressionsplasmiden für die Herstellung von FX $\alpha$ -Analogon

Mit der Aktivierung des Faktor X durch die Abspaltung des 4,5 kDa-Aktivierungspeptids am N-terminalen Ende der schweren Kette entsteht die Faktor X $\alpha$ -Form. Diese Form wird anschließend durch auto-proteolytische Aktivität und Abspaltung des C-Terminus der schweren Kette zwischen Arg 469 und Gly 470 in die FX $\alpha\beta$ -Form umgesetzt. Zur Herstellung von Faktor X-Expressionsplasmiden, die zur Produktion von Faktor X führen, die nach Aktivierung ausschließlich als FX $\alpha$ -Form mit intaktem  $\beta$ -Peptid vorliegen, wurde die Aminosäure Arg469 in Lys mutiert, sodaß keine Prozessierung im C-terminalen Bereich der schweren Kette mehr stattfinden kann.

Dazu wurde die C-terminale Aminosäuresequenz des Faktor X von Position 1363 bis zum Stopsignal durch partiellen BstEII-SpeI-Verdau entfernt und durch zwei zusammenligierte Oligonucleotidpaare ersetzt. Oligonucleotid #0005 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AAG GGC TTG CCC AAG-3') (SEQ. ID. Nr. 22) und Oligonucleotid #0006 (5'-TTG GCC TTG GGC AAG CCC TTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEQ.

- 43 -

ID. Nr. 23) wurden mit Oligonucleotid #0007 (5'-GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA GAT CCC A-3') (SEQ. ID. Nr. 24) und Oligonucleotid #0008 (5'-CTA GTG GGA TCT CAC TTT AAT GGA GAG GAC GTT ATG ACC TCC GGG GCA TGG CTC-3') (SEQ. ID. Nr. 25) ligiert. Die Mutation der Aminosäure Arg469 wird durch das Oligonucleotidpaar #0005-#0006 eingeführt. Eine schematische Darstellung der FX-Analoga ist in Figur 7 gezeigt.

#### **B e i s p i e l 7 :**

**Bestimmung der N-Termini von Faktor X und Prozessierungsprodukten mit und ohne rFurin**

Rekombinanter Faktor X wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, in CHO-Zellen mit endogenem Furin bzw., wie in Beispiel 5 beschrieben, in Furin-defizienten Zellen exprimiert. rFaktor X wurde sowohl aus a) nicht vorbehandeltem, b) weitere 12 Stunden bei 37°C inkubiertem und c) 12 Stunden bei 37°C mit CHO-rFurin-Überstand vorbehandeltem Zellkulturüberstand hochexprimierender CHO-rFX-Klone, als auch aus d) nicht vorbehandeltem und e) 12 Stunden bei 37°C mit CHO-rFurin-Überstand vorbehandeltem Zellkulturüberstand von CHO-FD11-rFX-Klone isoliert. Die N-terminalen Aminosäuren von Faktor X und Prozessierungsprodukten der einzelnen Reaktionsansätze a) bis e) wurden über Edman-Analyse bestimmt. Figur 8 zeigt eine schematische Darstellung der Ergebnisse.

Der rFaktor X aus hochexprimierenden CHO-Zellen tritt in Form der reifen schweren und leichten Ketten, sowie einzelkettig, zum Teil noch Propeptid-haltig auf. Nach einer Inkubation dieser Zellkulturüberstände für 12 Stunden bei 37°C (b) treten zusätzlich, wie schon von Wolf et al. (1991, J. Bio. Chem. 266:13726-13730) beschrieben, fehlerhafte N-Termini der rFX leichten Kette mit 3 zusätzlichen Aminosäuren Val38-Thr39-Arg40 auf. Diese kryptischen Enden werden auch bei der Sequenzierung von rFX-Material aus nicht vorbehandelten CHO-FD11-Zellen (d) gefunden. Diese Beobachtung zeigt, daß das Auftreten von diesen fehlerhaften N-Termini vermieden werden kann, indem optimierte Bedingungen bzw. Zellkulturbedingungen, Lagerung und Reinigungsverfahren zur Minimierung der rFX-Proteolyse durch CHO-Proteasen, benützt werden.

- 44 -

Im Gegensatz zu dem gereinigten Material aus CHO-Zellen (a und b) ist der rFX aus nicht amplifizierten, Furin-defizienten Zellen (d) nur in Form unprozessierter einzelkettiger Vorläufer vorhanden. Es werden auch keine N-terminalen Sequenzen gefunden, die dem Propeptid-Anteil entsprechen. Damit wurde gezeigt, daß die Prozessierung von einzelkettigem rFX-Vorläufer in leichte/schwere Kette in Furin defizienten CHO-Zellen (d) nicht mehr stattfindet, was auf eine zentrale Rolle der Endoprotease Furin in diesem Prozessierungsschritt in vivo schliessen läßt.

Zusätzlich wurde gezeigt, daß die Prozessierung Propeptid-haltiger rFX-Moleküle auch in Furin-defizienten CHO-Zellen stattfindet und daher Furin in vivo keine essentielle Rolle in diesem Prozessierungsschritt spielt. Durch die Inkubation von rFX aus CHO-Zellen (c) und CHO-FD11-Zellen (e) in Gegenwart von Furin werden ausschließlich leichte und schwere Ketten mit korrekten N-Termini gefunden. Damit wurde nachgewiesen, daß sowohl die einzelkettigen FX-Vorläufer als auch die Propeptid-haltigen rFX-Moleküle, durch in vitro-Prozessierung in homogenen, reifen Faktor X umgesetzt werden. Damit weist der in Gegenwart von Furin prozessierte Faktor X eine aussergewöhnliche strukturelle Integrität und Homogenität auf.

#### **B e i s p i e l 8:**

**Expression und Charakterisierung des FX-Analogon mit der Furin-Spaltstelle Arg-Arg-Lys-Arg/Ile (rFX<sup>RRKR/I</sup>).**

Zur Herstellung von rekombinantem rFX<sup>RRKR/I</sup>-Protein wurden das FX-Expressionsplasmid mit der Spaltstelle Arg-Arg-Lys-Arg/Ile (siehe Beispiel 6.1, Fig. 2 G) und das Selektionsplasmid pSV/dhfr, wie im Beispiel 1 beschrieben, in CHO-Zellen cotransfiziert. Die Western Blot-Analyse der Zellkultur-Überstände (Figur 9) zeigt, daß das rekombinante Protein vorwiegend in der doppelkettigen Form vorliegt. Im Vergleich zu Plasma FX läuft die schwere Kette bei 46kD anstatt 50kD, was vermutlich auf unterschiedliche Verzuckerungen des rekombinanten Proteins zurückzuführen ist. Zusätzlich sind, wie auch schon bei der Expression von Wild-typ rFX beobachtet (Beispiel 1.b.), geringe Mengen an einzelkettigem Vorläufer (SC) sowie die LC4-Isoform

- 45 -

der leichten Kette sichtbar. Diese molekularen Formen des rFX-Analogon weisen auf eine Limitierung sowohl der Prozessierung des einzelkettigen FX-Vorläufers durch endogene Proteasen als auch der  $\gamma$ -Carboxylierung der leichten Kette hin. Obwohl die in das FX-Analogon eingefügte Spaltstelle eine Furin-Consensus-Sequenz repräsentiert, sind keine Proteinbanden, die den aktivierten Formen des Proteins entsprächen (35kD, 31kD) sichtbar. Die Struktur im Bereich der Spaltstelle sowie die umgehende Aminosäuresequenz dürften dazu führen, daß die Prozessierung der modifizierten Aktivierungsstelle durch Furin nur suboptimale Bedingungen darstellen.

#### Beispiel 9:

##### In vitro-Aktivierung des rFX<sup>RRKR/I</sup>-Proteins durch rFurin-Derivate

Die Aktivierbarkeit des rekombinanten FX-Analogons in die  $\alpha$  (35kD) und  $\beta$  (31kD) FXa-Formen durch rFurin in vitro wurde, wie in Beispiel 2 für Mischexperimente beschrieben, getestet, mit dem Unterschied, daß gereinigte rFurin-Derivate rFurin $\Delta$ Cys-Spacer-10xHis, beschrieben in der Patentanmeldung EP 0 775 750 A2, in 10mM Hepes, pH 7,0, 150mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub> und 0,2% BSA statt CHO-rFurin-Überständen benützt wurden. Im Kontrollexperiment ohne rFurin wurde der CHO-rFX-Analogon-Überstand mit dem Puffer 10mM Hepes, pH 7,0, 150mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub> und 0,2% BSA in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Aliquots der Ansätze vor und nach einer Inkubationszeit von 6, 24, 48 und 72 (t=0, 6, 24, 48, 72) Stunden bei 37°C, wurden mittels Western Blot auf rFX-Aktivierung getestet (Fig. 10). Während das Bandenmuster von rFX<sup>RRKR/I</sup> in Abwesenheit des rFurin-Derivates selbst nach 72 Stunden Inkubation unverändert ist (Fig. 10 B) wird in Anwesenheit von rFurin schon nach 6 Stunden (Fig. 10 A, Spur 5) eine 35kD-schwere Proteinbande, die der  $\alpha$ -Form von plasmatischem FX entspricht, sichtbar (Fig. 10 A, Spur 9). Im Laufe der Inkubation akkumuliert diese  $\alpha$ -Form und nach 72 Stunden Inkubation (Fig. 10 A, Spur 8) sind etwa 50 % des Ausgangsmaterials (HC) in die aktivierte Form umgesetzt worden. Die zusätzliche 31kD schwere Proteinbande, die nach 24 Stunden (Fig. 10 A, Spur 6) erkennbar wird und der  $\beta$ -Form des aktivierten Plasma FX (Fig. 10

- 46 -

A, Spur 9) entspricht, zeigt, daß die aus rekombinanten FX-Analogen entstandene  $\alpha$ -Form eine autoproteolytische Aktivität besitzt und daher funktionell ist.

Diese Ergebnisse weisen nach, daß die heterologe Aktivierungsspaltstelle Arg-Arg-Lys-Arg/Ile im rFX-Analogon durch rFurin-Derivate in vitro spezifisch erkannt und korrekt gespalten wird, und somit zur Aktivierung des rFX-Analogon in  $\alpha$ - und  $\beta$ -FXa-Moleküle geeignet ist.

#### Beispiel 10:

Funktionalität des in vitro aktivierten rekombinanten FX-Analogons rFX<sup>RRKR/I</sup>.

Aliquots der Mischexperimente aus Beispiel 9 wurden mit einem Chromogen-Test auf FXa-Aktivität untersucht. Dazu wurden die Aliquots mit dem Chromogensubstrat S2337 (600  $\mu$ M) in 50mM Tris, pH 7,3, 150mM NaCl, 0,1% BSA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit 20% Essigsäure gestoppt und anschließend die OD bei 405nm gemessen. Im Vergleich mit einer Eichgerade, erstellt mittels gereinigtem, RVV-aktiviertem Plasma FXa, wurde die Menge an rekombinanter FXa-Aktivität in den Reaktionsansätzen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse, die eingesetzten Antigenmengen (ELISA-Werte), sowie die daraus berechnete spezifische Aktivität sind in Tabelle 2 dargestellt.

Um unspezifische amidolytische Aktivitäten in der rFurin-Lösung und dem CHO-Zellkulturüberstand auszuschließen, wurde auch das Gemisch eines Überstandes nicht transfizierter CHO-Zellen mit gereinigtem rFurin-Derivat auf FXa-Aktivität (CHO+rFurin) untersucht. In diesem Gemisch, genau wie im rFX-Analogon/Puffer-Gemisch (rFX<sup>RRKR/I</sup>+Puffer), konnte auch nach 72 Stunden Inkubation keine FXa-Aktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu war bei der rFX<sup>RRKR/I</sup>/rFurin-Reaktion bereits nach 6 Stunden Inkubation eine rFXa-Aktivität von 56mU meßbar, die konstant im Laufe der Inkubation anstieg und nach 72 Stunden 133mU erreichte. Obwohl zu diesem Zeitpunkt, laut Western Blot, nur etwa die Hälfte des rFX-Analogons in die aktivierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen umgesetzt wor-



den war (Fig.10 A, Spur 8), erreichte das in vitro aktivierte rFX-Analogon-Material mit 190mU/ $\mu$ g eine weit höhere spezifische Aktivität als der mit RVV vollständig aktivierte Plasma FX (153mU/ $\mu$ g). Die gemessenen Aktivitätssteigerungen spiegeln sich im Auftreten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen im Western Blot wider (Fig. 10 A, Spur 5-8).

Damit wird nachgewiesen, daß in FX heterologe Protease-Schnittstellen eingebaut werden können, letztere von der zugehörigen Protease erkannt und gespalten werden, und hochwertiger rFXa (oder ggf. rFXa-Analoga mit FXa-Aktivität) in funktioneller Form rekombinant hergestellt werden kann.

Tabelle 2

	Inkubation in Stunden	Aktivität in mU/ml	Antigen- Menge in $\mu$ g/ml	Spezifische Aktivität in mU/ $\mu$ g
rFX <sup>RRKR/I</sup> + Puffer	0	<25	0,7	0
	6	<25	0,7	0
	24	<25	0,7	0
	48	<25	0,7	0
	72	<25	0,7	0
rFX <sup>RRKR/I</sup> + rFurin	0	<25	0,7	0
	6	56	0,7	80
	24	101	0,7	144
	48	124	0,7	177
	72	133	0,7	190
CHO + rFurin	0	<25	0	
	6	<25	0	
	24	<25	0	
	48	<25	0	
	72	<25	0	
RVV aktivierter Plasma FX		614	4	153

**B e i s p i e l 11:**

In vitro-Aktivierung von rFX-Analogen mit der FXIa-Spaltstelle Asp-Phe-Thr-Arg/Val (rFX<sup>DFTR/V</sup>) durch plasmatischen FXIa.

Durch Mutagenese der FX-Aktivierungssequenz in eine FXIa-Spaltstelle wurde ein FX-Analogen-Konstrukt hergestellt. Anschließend wurden stabile CHO-Zellklone erstellt, die diese Moleküle exprimieren. CHO-Zellkulturüberstand mit rFX<sup>DFTR/V</sup> wurden mit gereinigtem plasmatischen FXIa (100 µg/ml) in Anwesenheit von 10mM Tris, pH 7,3, 150mM NaCl, 8mM CaCl<sub>2</sub>, PCPS und 0,1% BSA gemischt und auf 37°C für verschiedene Zeiten inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Zellkulturüberstand nur mit dem BSA-haltigen Puffer inkubiert. Das rFX<sup>DFTR/V</sup>-Protein und die resultierenden Aktivierungsprodukte wurden mittels Western Blot-Analyse charakterisiert (Figur 11). Wie im Gemisch ohne FXIa vor der Inkubation (t=0) erkennbar ist, wird das rekombinante Protein (Fig. 11, Spur 5) fast identisch zum plasmatischen FX (Spur 2) in der doppelkettigen Form sekretiert mit dem Unterschied, daß die schwere Kette (HC), wie auch schon beim rFX<sup>RRKR</sup> aus dem Beispiel 8 beobachtet, ein geringfügig kleineres Molekulargewicht als 50kD hat. Während der Inkubation dieses Gemisches bei 37°C (Fig. 11, Spur 6) ist keine wesentliche Änderung des Bandenmusters sichtbar. Im CHO-rFX/FXIa-Gemisch sind, schon kurz nach der Zugabe von gereinigtem FXIa aber vor der eigentlichen Inkubation des Zellkulturüberstandes (Fig. 11, Spur 3), Proteinbanden von 35kD und 31kD zu erkennen, die der Größe der plasmatischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen der schweren Kette (Fig. 11, Spur 9) entsprechen. Diese beiden Formen nehmen nach 4 stündiger Inkubation mit FXIa stark zu (Fig. 11, Spur 4).

Hierdurch wurde gezeigt, daß ein FX-Analogen, das die heterologe Proteaseschnittstelle für ein in der Gerinnungskaskade aktives proteolytisches Enzym trägt, vom letzteren auch erfolgreich prozessiert werden kann.

Zusätzlich wird durch das Auftreten der rFX $\alpha\beta$ -Bande, dem Ergebnis der autoproteolytischen Aktivität des rFX $\alpha$ -Analgon, erfolgreich die funktionelle Aktivität des resultierenden rFX $\alpha$ -Analogen gezeigt.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: IMMUNO AG  
(B) STRASSE: Industriestrasse 67  
(C) ORT: Wien  
(D) BUNDESLAND: Austria  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 1220

(A) NAME: Michele Himmelspach  
(B) STRASSE: Breitstetten 19  
(C) ORT: Leopoldsdorf  
(D) BUNDESLAND: Austria  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 2285

(A) NAME: Uwe Schlokat  
(B) STRASSE: Hauptstrasse 51  
(C) ORT: Orth/Donau  
(D) BUNDESLAND: Austria  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 2304

(A) NAME: Andreas Fisch  
(B) STRASSE: Wiener Strasse 14  
(C) ORT: Orth/Donau  
(D) BUNDESLAND: Austria  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 2304

(A) NAME: Friedrich Dorner  
(B) STRASSE: Peterlinigasse 17  
(C) ORT: Wien  
(D) BUNDESLAND: Austria  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 1238

(A) NAME: Johann Eibl  
(B) STRASSE: Gustav Tschermakgasse 2  
(C) ORT: Wien  
(D) BUNDESLAND: Austria  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 1180

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Faktor X Analoge mit modifizierter  
Proteasespaltstelle

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 27

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

- 50 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATTACTCGAG AAGCTTACCA TGGGGCGCCC ACTG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATTACAATTG CTGCAGGGAT CCAC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CCCACAGGGC CCTACCCCTG T

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

- 51 -

ACCAGTTAAC CCTGGTGAAG TCGTTGTCGC CCCTCTC

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ACCATCGCGA CCTGGTCAGG TTGTTGTC

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ACCAGAATCG ATTCTGGGTT TGATGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACCAGAATCG ATTCTGGTCA TGCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- 52 -

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ACCAGAATCG ATTCTTCCTT GGGGGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ACCAGAATCG ATTCTCGTTT TCATGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ACCAGAATCG ATTCTTCCCT CGATGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ACCAGAATCG ATTCTTTTCC TCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

- 53 -

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

ACCAGAATCG ATTCTCCTCA CCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ACCAGAATCG ATTCTCCTCC TCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

ACCAGAATCG ATTCTTTTGG GCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

- 54 -

ACCAGAATCG ATTCTTTTCC TGATGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

ACCAGAATCG ATTCTTTTGC TCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

ACCAGAATCG ATTCTGGTCA CCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

ACCAGAATCG ATTCTTTTGA GCCTGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear



- 55 -

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

ACCAGAATCG ATTCTCGTGC TCGTGTTGTC GCCCCTCTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GTCACCGCCT TCCTCAAGTG GATCGACAGG TCCATGAAAA CCAGGTGAA

49

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

CTAGTTCACC TGGTTTTTCAT GGACCTGTGC ATCCACTTGA GGAAGGCG

48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

GTCACCGCCT TCCTCAAGTG GATCGACAGG TCCATGAAAA CCAAGGGCTT GCCCAAG

57

- 56 -

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 57 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

TTGGCCTTGG GCAAGCCCTT GGTTCATG GACCTGTCGA TCCACTTGAG GAAGGCG

57

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 55 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GCCAAGAGCC ATGCCCCGGA GGCATAACG TCCTCTCCAT TAAAGTGAGA TCCCA

55

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

CTAGTGGGAT CTCACTTTAA TGGAGAGGAC GTTATGACCT CCGGGGCATG GCTC

54

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 1467 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- 57 -

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..1467

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

ATG GGG CGC CCA CTG CAC CTC GTC CTG CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC	48
Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly	
1 5 10 15	
CTC CTG CTG CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC	96
Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn	
20 25 30	
AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG	144
Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met	
35 40 45	
AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC TGC TCA TAC	192
Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr	
50 55 60	
GAA GAG GCC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC	240
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe	
65 70 75 80	
TGG AAT AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG	288
Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln	
85 90 95	
AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT	336
Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys	
100 105 110	
TTA GAA GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC ACA CGG AAG CTC	384
Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu	
115 120 125	
TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG	432
Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln	
130 135 140	
AAC TCT GTG GTG TGC TCC TGC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC	480
Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn	
145 150 155 160	
GGC AAG GCC TGC ATT CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC	528
Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr	
165 170 175	
CTG GAA CGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC ACC AGC AGC AGC GGG	576
Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly	
180 185 190	
GAG GCC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG	624
Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu	
195 200 205	

- 58 -

GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln 210 215 220	672
CCT GAG AGG GGC GAC AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA GGC CAG GAA Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu 225 230 235 240	720
TGC AAG GAC GGG GAG TGT CCC TGG CAG GCC CTG CTC ATC AAT GAG GAA Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu 245 250 255	768
AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC CTA Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu 260 265 270	816
ACG GCA GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC AAG GTG AGG GTA Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val 275 280 285	864
GGG GAC CGG AAC ACG GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu 290 295 300	912
GTG GAG GTG GTC ATC AAG CAC AAC CGG TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp 305 310 315 320	960
TTC GAC ATC GCC GTG CTC CGG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC CGC ATG Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met 325 330 335	1008
AAC GTG GCG CCT GCC TGC CTC CCC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr 340 345 350	1056
CTG ATG ACG CAG AAG ACG GGG ATT GTG AGC GGC TTC GGG CGC ACC CAC Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His 355 360 365	1104
GAG AAG GGC CGG CAG TCC ACC AGG CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr 370 375 380	1152
GTG GAC CGC AAC AGC TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC ATC ACC CAG Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln 385 390 395 400	1200
AAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln 405 410 415	1248
GGG GAC AGC GGG GGC CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe 420 425 430	1296
GTG ACA GGC ATC GTC AGC TGG GGA GAG AGC TGT GCC CGT AAG GGG AAG Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys 435 440 445	1344

- 59 -

TAC GGG ATC TAC ACC AAG GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG 1392  
 Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg  
 450 455 460

TCC ATG AAA ACC AGG GGC TTG CCC AAG GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG 1440  
 Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu  
 465 470 475 480

GTC ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA 1467  
 Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys \*  
 485

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) L NGE: 489 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn  
 20 25 30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met  
 35 40 45

Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr  
 50 55 60

Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe  
 65 70 75 80

Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln  
 85 90 95

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys  
 100 105 110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu  
 115 120 125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln  
 130 135 140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn  
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr  
 165 170 175

Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly  
 180 185 190

- 60 -

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu  
 195 200 205  
 Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln  
 210 215 220  
 Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu  
 225 230 235 240  
 Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu  
 245 250 255  
 Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu  
 260 265 270  
 Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val  
 275 280 285  
 Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu  
 290 295 300  
 Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp  
 305 310 315 320  
 Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met  
 325 330 335  
 Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr  
 340 345 350  
 Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His  
 355 360 365  
 Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr  
 370 375 380  
 Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln  
 385 390 395 400  
 Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln  
 405 410 415  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe  
 420 425 430  
 Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys  
 435 440 445  
 Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg  
 450 455 460  
 Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu  
 465 470 475 480  
 Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys \*  
 485

- 61 -

## P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Faktor X-Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im Bereich der natürlicherweise vorkommenden Faktor Xa-Aktivierungsspaltstelle aufweist, wobei die Modifikation eine Prozessierungsstelle einer nicht-natürlicherweise in diesem Bereich der Faktor X-Sequenz spaltenden Protease darstellt.

2. Faktor X-Analogon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation mindestens eine Aminosäure innerhalb der Aminosäuresequenz des Aktivierungspeptids betrifft.

3. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation einen Austausch mindestens einer der Aminosäuren zwischen Gly228 und Arg234, und gegebenenfalls Ile235, bezogen auf die Aminosäurenumerierung gemäß Fig. 1, darstellt.

4. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Faktor X-Sequenz mit Gly228-R6-R5-R4-R3-R2-Arg234-R1 enthält, wobei

- a) R1 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ile, Val, Ser, Thr oder Ala
- b) R2 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Pro, Gly, Lys oder Arg
- c) R3 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Lys, Met, Gln, Glu, Ser, Val, Arg oder Pro
- d) R4 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asp, Ile, Ser, Met, Pro, Thr, Arg oder Lys
- e) R5 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asn, Lys, Ser, Glu, Ala, Gln, His oder Arg und
- f) R6 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asp, Phe, Thr, Arg, Leu oder Ser ist.

5. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Prozessierungsstelle für eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor XIIa,

- 62 -

Faktor XIa, Faktor Xa oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, darstellt.

6. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es eine weitere Modifikation im Bereich der C-terminalen Faktor X-Aminosäuresequenz aufweist.

7. Faktor X-Analogon nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im C-terminalen Bereich der  $\beta$ -Peptidspaltstelle aufweist.

8. Faktor X-Analogon nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Mutation, Deletion oder Insertion im Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz zwischen Aminosäureposition Arg469 und Ser476 ist.

9. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Abspaltung des  $\beta$ -Peptids verhindert.

10. Faktor X-Analogon nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Deletion des Faktor X  $\beta$ -Peptids aufweist.

11. Faktor X-Analogon nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich der Faktor X-Sequenz aufweist.

12. Faktor X-Analogon nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Translationsstoppsignal an der Position der Aminosäure 470 der Faktor X-Sequenz aufweist.

13. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation im Bereich des Aktivierungspeptids eine Aktivierung des Faktor X-Analogons zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon in vitro erlaubt.

14. Faktor X-Analogon nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Aktivierung durch eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2,



Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, erlaubt.

15. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Aktivierung von Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon in vivo erlaubt.

16. Faktor X-Analogon nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Aktivierung durch eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor IIa, Faktor Xa oder durch Kallikrein erlaubt.

17. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es als Faktor X-Analogon mit intaktem  $\beta$ -Peptid oder als ein C-terminal verkürztes Faktor-Analogon vorliegt.

18. Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es als einzelkettiges Molekül vorliegt.

19. Rekombinante DNA kodierend für ein Faktor X-Analogon nach einem der Ansprüche 1 bis 18, enthalten in einem Vektor zur rekombinanten Expression des kodierten Proteins.

20. Präparation enthaltend ein gereinigtes Faktor X-Analogon oder ein Vorläuferprotein davon mit einer Modifikation im Bereich der natürlicherweise vorkommenden Faktor X-Aktivierungsstelle, wobei die Modifikation eine Prozessierungsstelle einer nicht-natürlicherweise in diesem Bereich der Faktor X-Sequenz spaltenden Protease darstellt.

21. Präparation nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Spaltstelle für eine Protease, ausgewählt aus der Gruppe der bibasischen Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein darstellt.

22. Präparation nach einem der Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als FX $\alpha$ -Analogon vorliegt.
23. Präparation nach einem der Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als C-terminal verkürztes Faktor X-Analogon vorliegt.
24. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül in isolierter Form enthält.
25. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein einzelkettiges Faktor X-Analogon in enzymatisch inaktiver Form mit einer Reinheit von mindestens 80 %, vorzugsweise 90 %, besonders bevorzugt von 95 % und keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon enthält.
26. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X-Analogon als zweikettiges Molekül in isolierter Form enthält.
27. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Faktor X-Analogon enthält, das eine Modifikation aufweist, die eine Aktivierung von Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon in vitro erlaubt.
28. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.
29. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, in Kombination mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor XIIa, Faktor XIa,

- 65 -

Faktor Xa, Faktor IIa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, vorliegt.

30. Präparation nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten räumlich voneinander getrennt vorliegen.

31. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Faktor X-Analogon enthält, das eine Modifikation aufweist, die eine Aktivierung von Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon in vivo erlaubt.

32. Präparation enthaltend Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, die insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Faktor X-Abbauprodukten, erhältlich durch Aktivierung eines Faktor X-Analogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19.

33. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen physiologisch akzeptablen Träger enthält und in einer lagerstabilen Form vorliegt.

34. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegebenenfalls als weiteren Bestandteil einen Blutfaktor oder eine aktivierte Form eines Blutfaktors enthält.

35. Präparation nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie als weiteren Bestandteil mindestens eine Komponente mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität enthält.

36. Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert und gegebenenfalls als Mehrfachkomponentenpräparat vorliegt.

37. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 20 bis 36 zur Herstellung eines Arzneimittels.

- 66 -

38. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Arzneimittels.

39. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend gereinigtes rekombinantes Faktor X-Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß ein durch rekombinante Herstellung gewonnenes Faktor X-Analogon isoliert und über ein chromatographisches Verfahren gereinigt wird.

40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte umfaßt:

- Bereitstellen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 19
- Transformation einer geeigneten Zelle
- Expression eines Faktor X-Analogons,
- gegebenenfalls Inkubieren des Faktor X-Analogons mit einer Protease
- Isolieren des Faktor X-Analogons und
- Reinigung des Faktor X-Analogons über ein chromatographisches Verfahren.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als zweikettiges Molekül isoliert wird.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß das zweikettige Faktor X-Analogon mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, der Gruppe der Serinproteasen, wie etwa Faktor IIa, Faktor XIIa, Faktor XIa, Faktor Xa, oder von Kallikrein, oder einem Derivat dieser Proteasen, in Kontakt gebracht wird, unter Bedingungen unter denen das Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa oder einem Faktor Xa-Analogon gespalten wird.

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine Zelle ist, die eine Protease, die eine Spaltung der Einzelkette in leichte und schwere Kette von Faktor X bzw. eines Faktor X-Analogons ausführen kann, nicht exprimiert und gegebenenfalls eine Defizienz der Protease aufweist.

44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle keine Endoprotease, wie etwa Kexin, Furin, PACE oder ein Derivate davon exprimiert.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert wird.

46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß einzelkettiges, gegebenenfalls isoliertes Faktor X-Analogon mit einer Protease, ausgewählt aus der Gruppe der Endoproteasen, wie etwa Kexin/Kex2, Furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, oder einem Derivat dieser Proteasen in Kontakt gebracht wird, unter Bedingungen, unter denen einzelkettiges Faktor X-Analogon in die zweikettige Faktor X-Form gespalten wird.

47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß einzelkettiges Faktor X-Analogon gegebenenfalls durch in Kontakt-Bringen mit der Protease direkt zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon aktiviert wird.

48. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß zweikettiges Faktor X-Analogon mit einer weiteren, von der ersten verschiedenen Protease in Kontakt gebracht wird und zu Faktor Xa-Analogon oder nativem Faktor Xa aktiviert wird.

49. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease immobilisiert ist.

50. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend aktiven Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß ein gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 46 hergestelltes Faktor X-Analogon einem Aktivierungsschritt unterzogen wird.

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß gereinigtes Faktor Xa-Analogon oder nativer Faktor Xa mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, der insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa-Intermediaten, gewonnen wird.

1/13

(-40)																			
1																			
Met	Gly	Arg	Pro	Leu	His	Leu	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	
ATG	GGG	CGC	CCA	CTG	CAC	CTC	GTC	CTG	CTC	AGT	GCC	TCC	CTG	GCT	GGC	CTC	CTG	CTG	
		9			18		27			36			45			54			
															(-4)				
															(-1)				
															40				
Leu	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	Glu	Gln	Ala	Asn	Asn	Ile	Leu	Ala	Arg	Val	Thr
CTC	GGG	GAA	AGT	CTG	TTC	ATC	CGC	AGG	GAG	CAG	GCC	AAC	AAC	ATC	CTG	GCG	AGG	GTC	ACG
	66				75		84			93			102		111		120		
(+1)																			
41																			
Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Glu	Glu	Met	Lys	Lys	Gly	His	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Met	Glu	Thr
GCC	AAT	TCC	TTT	CTT	GAA	GAG	ATG	AAG	AAA	GGA	CAC	CTC	GAA	AGA	GAG	TGC	ATG	GAA	ACC
	129				138		147		156		165		174		183				
Cys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asp	Ser	Asp	Lys	Thr	Asn	Glu	Phe	Trp
TGC	TCA	TAC	GAA	GAG	GCC	CGC	GAG	GTC	TTT	GAG	GAC	AGC	GAC	AAG	ACG	AAT	GAA	TTC	TGG
	192				201		210		219		228		237		246				
Lys	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Glu	Thr	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Lys
AAA	TAC	AAA	GAT	GGC	GAC	CAG	TGT	GAG	ACC	AGT	OCT	TGC	CAG	AAC	CAG	GGC	AAA	TGT	AAA
	255				264		273		282		291		300		309				
Gly	Leu	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Phe
GGC	CTC	GGG	GAA	TAC	ACC	TGC	ACC	TGT	TTA	GAA	GGA	TTC	GAA	GGC	AAA	AAC	TGT	GAA	TTA
	318				327		336		345		354		363		372				
Thr	Arg	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln
ACA	CGG	AAG	CTC	TGC	AGC	CTG	GAC	AAC	GCG	GAC	TGT	GAC	CAG	TTC	TGC	CAC	GAG	GAA	CAG
	381				390		399		408		417		426		435				
Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile
TCT	GTG	GTG	TGC	TCC	TGC	GCC	CGC	GGG	TAC	ACC	CTG	GCT	GAC	AAC	GGC	AAG	GCC	TGC	ATT
	444				453		462		471		480		489		498		498		
178 179 180 181 182 183																			
Thr	Gly	Pro	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Gln
ACA	GGG	CCC	TAC	CCC	TGT	GGG	AAA	CAG	ACC	CTG	GAA	CGC	AGG	AAG	AGG	TCA	GTG	GCC	CAG
	507				516		525		534		543		552		561				
Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Trp	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ala	Asp
ACC	AGC	AGC	AGC	GGG	GAG	GCC	CCT	GAC	AGC	ATC	ACA	TGG	AAG	CCA	TAT	GAT	GCA	GCC	GAC
	570				579		588		597		606		615		624				
R6																			
229																			
Asp	Pro	Thr	Glu	Asn	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Asp	Phe	Asn	Gln	Thr	Gln	Pro	Glu	Arg	Gly
GAC	CCC	ACC	GAG	AAC	CCC	TTC	GAC	CTG	CTT	GAC	TTC	AAC	CAG	ACG	CAG	CCT	GAG	AGG	GGC
	633				642		651		660		669		678		687				
R5 R4 R3 R2 R1																			
234 235																			
Asn	Asn	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln
AAC	AAC	CTC	ACC	AGG	ATC	GTG	GGA	GGC	CAG	GAA	TGC	AAG	GAC	GGG	GAG	TGT	CCC	TGG	CAG
	696				705		714		723		732		741		750				

Fig. 1-1

2/13

Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile
CTG	CTC	ATC	AAT	GAG	GAA	AAC	GAG	GGT	TTC	TGT	GGT	GGA	ACT	ATT	CTG	AGC	GAG	TTC	TAC	ATC
					759	768		777			786			795			804			813
Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Asn
CTA	ACG	GCA	GCC	CAC	TGT	CTC	TAC	CAA	GCC	AAG	AGA	TTC	AAG	GTG	AGG	GTA	GGG	GAC	CGG	AAC
		822			831			840			849			858			867			876
Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg
ACG	GAG	CAG	GAG	GAG	GGC	GGT	GAG	GCG	GTG	CAC	GAG	GTG	GAG	GTG	GTC	ATC	AAG	CAC	AAC	CGG
		885			894			903			912			921			930			939
Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe
TTC	ACA	AAG	GAG	ACC	TAT	GAC	TTC	GAC	ATC	GCC	GTG	CTC	CGG	CTC	AAG	ACC	CCC	ATC	ACC	TTC
		948			957			966			975			984			993			1002
Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr
CGC	ATG	AAC	GTG	GCG	CCT	GCC	TGC	CTC	CCC	GAG	CGT	GAC	TGG	GCC	GAG	TCC	ACG	CTG	ATG	ACG
		1011			1020			1029			1038			1047			1056			1065
Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg
CAG	AAG	ACG	GGG	ATT	GTG	AGC	GGC	TTC	GGG	CGC	ACC	CAC	GAG	AAG	GCC	CGG	CAG	TCC	ACC	AGG
		1074			1083			1092			1101			1110			1119			1128
Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	Phe	Ile
CTC	AAG	ATG	CTG	GAG	GTG	CCC	TAC	GTG	GAC	CGC	AAC	AGC	TGC	AAG	CTG	TCC	AGC	AGC	TTC	ATC
		1137			1146			1155			1164			1173			1182			1191
Ile	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp
ATC	ACC	CAG	AAC	ATG	TTC	TGT	GCC	GGC	TAC	GAC	ACC	AAG	CAG	GAG	GAT	GCC	TGC	CAG	GGG	GAC
		1200			1209			1218			1227			1236			1245			1254
Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp
AGC	GGG	GGC	CCG	CAC	GTG	ACC	CGC	TTC	AAG	GAC	ACC	TAC	TTC	GTG	ACA	GGC	ATC	GTC	AGC	TGG
		1263			1272			1281			1290			1299			1308			1317
Gly	Glu	Ser	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys
GGA	GAG	AGC	TGT	GCC	CGT	AAG	GGG	AAG	TAC	GGG	ATC	TAC	ACC	AAG	GTG	ACC	GCC	TTC	CTC	AAG
		1326			1335			1344			1353			1362			1371			1380
Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val
TGG	ATC	GAC	AGG	TCC	ATG	AAA	ACC	AGG	GGC	TTG	CCC	AAG	GCC	AAG	AGC	CAT	GCC	CCG	GAG	GTC
		1389			1398			1407			1416			1425			1434			1443
Ile	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys	TER													
ATA	ACG	TCC	TCT	CCA	TTA	AAG	TGA													
		1452			1461		1467													

Prä-/Propeptid  
 'Connecting' Tripeptid  
 Aktivierungs-Peptid

Fig. 1-2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**